



**EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN Y CONTENIDO DE
COMPUESTOS ANTIOXIDANTES DEL FRUTO DE MORA DE CASTILLA (*Rubus
Glaucus Benth*) UTILIZANDO CLORURO DE COLINA: UREA COMO SOLVENTE
EUTÉCTICO Y ULTRASONIDO EN COMPARACIÓN CON UNA TÉCNICA DE
EXTRACCIÓN CONVENCIONAL**

Yiseth Fandiño Moreno

Universidad Nacional Abierta y a Distancia

Escuela de Ciencias Básicas Tecnología e Ingeniería

Pregrado en Química

Bogotá D.C., Colombia

2020

**EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN Y CONTENIDO DE
COMPUESTOS ANTIOXIDANTES DEL FRUTO DE MORA DE CASTILLA (*Rubus
Glaucus Benth*) UTILIZANDO CLORURO DE COLINA: UREA COMO SOLVENTE
EUTÉCTICO Y ULTRASONIDO EN COMPARACIÓN CON UNA TÉCNICA DE
EXTRACCIÓN CONVENCIONAL**

Yiseth Fandiño Moreno

Proyecto de investigación presentado como requisito para optar al título de:

Químico

Director:

Licenciado en Química, M.Sc. Ciencias-Química. PhD. Diego Ballesteros Vivas

Codirectora

Químico, Esp. Administración y Gerencia de Sistema de Calidad. – Alba Marina Ramírez
Baquero

Universidad Nacional Abierta y a Distancia

Escuela de Ciencias Básicas Tecnología e Ingeniería

Pregrado en Química

Bogotá D.C., Colombia

2020

Dedicatoria

*A Dios, por darme la fortaleza, conocimiento,
dedicación y la paciencia para
afrontar cada etapa
y cada paso que doy en la vida.*

*A mi mamá, que ha sido mi apoyo incondicional y el
ejemplo de que, aunque la vida no es fácil
es necesario asumir retos para cada día ser
mejor ser humano.*

QUIERO SER COMO EL ELEFANTE

Con pies grandes y pesados

Para tenerlo bien fijos en la tierra y no elevarnos.

Con orejas grandes...para aprender a oír y no actuar a ciegas.

Con boca chica...para no parafraseando, ni hablar demás.

Un colmillo largo... para saber actuar en momento difíciles.

Tener piel áspera y dura. Para aguantar lo embates de los demás.

Tener cola corta...para que nadie por más que quiera, pueda hablar de ti.

Tener su memoria...para que no olvides quien realmente eres.

Anónimo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios en primera medida, porque siempre hay un ser superior que te escucha y te guía.

A mis padres, mis hermanos y mis sobrinos que están siempre acompañándome en todas las metas que me he propuesto.

A mis entrañables amigos Jimmy, Marcela, Alba y Jasbleidy que fueron mi apoyo al sentarse a mi lado para hacer trabajos, al recibir una explicación y guiarme en un laboratorio, brindándome un espacio para hacer todas las actividades y por último por compartir un sueño. Pero sobre todo por abrirme un espacio en su buen corazón como amigos y valoraron el esfuerzo que he realizado.

A mi tutor Diego, que siempre saco un espacio para enseñarme para guiarme y para darme las herramientas para ser un buen profesional y que definitivamente es un ejemplo a seguir.

A la Universidad Nacional Abierta y a Distancia y al grupo de Docentes que integra esta magnífica área de ciencias que crearon en mí una ilusión y con mucha constancia se están logrando un peldaño en mi vida personal.

Resumen

En este trabajo se estudió la eficiencia de la mezcla eutéctica natural cloruro de colina: urea asistida por ultrasonido para obtener extractos enriquecidos en compuestos antioxidantes a partir del fruto *Rubus glaucus* Benth. Particularmente, el contenido total de fenoles, el contenido total de antocianinas, la actividad antioxidante (medida por los métodos DPPH y ABTS) y el rendimiento de extracción fueron determinados en los extractos obtenidos en el medio eutéctico profundo. Soxhlet fue usado como técnica de extracción de referencia para fines comparativos. La aplicación de la mezcla eutéctica natural cloruro de colina:urea asistida por ultrasonido permitió obtener extractos del fruto de *R. glaucus* con capacidad para inhibir radicales libres.

Abstract

In this work, the efficiency of choline-chloride:urea as a natural deep solvent assisted by ultrasound to recover extracts enriched in antioxidant compounds from *Rubus glaucus* Benth fruit was studied. In particular, total phenolic content, total anthocyanin content, antioxidant activity (measured by DPPH and ABTS methods), and extraction yield were determined in the extracts obtained in eutectic deep media. Soxhlet was used as reference extraction technique for comparative purposes. The application of choline-chloride:urea assisted by ultrasound allowed to obtain extracts from *R. glaucus* with capacity to inhibit free radical.

TABLA DE CONTENIDO

Abstract	5
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
2. INTRODUCCIÓN	14
3. MARCO DE REFERENCIA.....	17
3.1 Mora de Castilla (<i>Rubus Glaucus Benth</i>).....	17
3.2 Compuestos Polifénolicos	20
3.3 Aspectos estructurales y propiedades de los flavonoides.....	21
3.3.1 Flavan-3-oles	22
3.3.2 Proantocianidinaas.....	23
3.4 Antocianinas.....	25
3.4.1 Ciadin-3-O-glucosido (C ₃ G).....	29
3.5 Métodos para evaluar la actividad antioxidante, el contenido total de fenoles y el contenido total de antocianinas	31
3.5.1 ABTS (ácido 2,2´azinobis(6-sulfonato-3-etilbenzotiazolina)	32
3.5.2 DPPH: (2,2 –difetil-1-picrilhidracilo)	33
3.6 Contenido de fenoles y de antocianinas	34
3.6.1 Ensayo Folin –Ciocalteu (FC)	34
3.6.2 Cuantificación de antocianinas	35
3.7 Técnicas de extracción y disolventes	37
3.7.1 Extracción Soxhlet:.....	38
3.7.2 Extracción asistida por Ultrasonido:.....	39
3.8 Solventes	40
3.8.1 Solventes polares	40
3.8.2 Solventes apolares	41
3.8.3 Solventes orgánicos:.....	41
3.8.4 Puros:	41
3.8.5 Simples:	42
3.9 Disolventes Profundos (DES)	42

4. JUSTIFICACIÓN	46
5. OBJETIVOS	49
5.1 Objetivo General	49
5.2 Objetivo Específicos	49
6. METODOLOGÍA.....	51
6.1.1 Reactivos y solventes	52
6.1.2 Preparación del material vegetal	54
6.1.3. Obtención de extractos	54
6.1.3.1 Método Soxhlet.....	54
6.1.3.2 Extracción asistida por ultrasonido (EAU).....	55
6.1.3.3 Diseño experimental	55
6.1.3.4 Determinación de rendimientos.....	56
6.1.4 Evaluación del Contenido Total de Fenoles (CTF).....	57
6.1.5. Evaluación del contenido total de antocianinas (CTA).....	57
6.1.6 Evaluación de la actividad antioxidante.....	58
6.1.6.1 DPPH.....	58
6.1.6.2. ABTS	58
6.1.7. Identificación analito de interés 3-cianidina-glucosido	59
6.1.7.1. Cromatografía Liquida de Alta Eficiencia HPLC	59
7. RESULTADOS	60
Capacidad Total de Fenoles (CTF).....	64
Contenido Total de Antocianinas CTA	65
Actividad antioxidante.....	68
Identificación de antocianinas - Cromatografía Liquida de Alta Eficiencia HPLC	72
8. CONCLUSIONES	74
RECOMENDACIONES.....	81
BIBLIOGRAFÍA	82

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional de la mora de Castilla (Rubus Glaucus). Adaptada del Estudio Potencial Antioxidante de la Mora de Castilla	19
Tabla 2. Antocianinas más comúnmente conocidas. Adaptado de la Tesis Análisis Químico de Antocianinas en Frutos Silvestres Colombianos.	26
Tabla 3. Antocianidinas identificadas en estudio para Rubus Glaucus Benth. Adaptado de la Tesis Doctoral. Efectos vasculares de la quecertina; interacciones y papel de los procesos de conjugación y desconjugación metabólica.....	28
Tabla 4. Propiedades de la mora de Castilla aplicadas en el ser humano	30
Tabla 5. Clasificación de los métodos para evaluar la actividad antioxidante de acuerdo con las reacciones involucradas. Tomada de la tesis Determinación de Antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante en licores y frutos de mora.	31
Tabla 6. Métodos de extracción de antocianinas. Tomado y adaptado de la Tesis Determinación de Antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante licores y fruto de mora.....	35
Tabla 7. Diseño experimental exploratorio para el proceso EAU	56
Tabla 8. Resumen resultados de Laboratorio	61
Tabla 9. Resultados para la prueba T student.	63
Tabla 10. Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra.....	64
Tabla 11. Promedio de absorbancia en pH 1 y pH 4.5 en los tiempos establecidos	66
Tabla 12. Promedio de los pigmentos Antocianos Monoméricos (PAM) en los tiempos establecidos	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tomada de boletín mensual. El cultivo de la mora de Castilla (<i>Rubus Glaucus Benth</i>) frutal de clima frio moderado, con propiedades curativas para la salud humana.	18
Figura 2. Clasificación de los polifenoles y algunos ejemplos representativo.....	20
Figura 3. Estructura Básica del flavonoide.Adaptado de la Tesos Análisis Químico e Antocianinas en Frutos Silvestres Colombianos	21
Figura 4. Estructuras básicas de los subgrupos de los flavonoide.Adaptado de la Tesis Análisis Químico de Antocianinas en Frutos Silvestres Colombianos.....	22
Figura 5. Estructuras químicas de los principales flavonoles de la dieta Adapatado de la Tesis Análisis Quimico de Antocianina en Frutos Silvestres Colombianos.	23
Figura 6. Ejemplo de tanino condensado. Adapatado de la Tesis Análisis Quimico de Antocianinas en Frutos Silvestres Colombianos	25
Figura 7. Estructura antocianina Adaptado de la Tesis Análisis Quimico de Antocianinas en Frutos Silvestres Colombianos.....	26
Figura 8. Cianidina-3-Glucosido. Adaptada de la Tesis Evaluacion de las Propdades bioactivas de la mora (<i>Rubus Glaucus Benth</i>) y Agraz (<i>Vaccinium meridionales Swarts</i>), en fresco y durante proceso de transformacion	29
Figura 9. Reacción de formación de radical ABTS-+ e interacción de éste con el antioxidante natural de los alimentos.....	33
Figura 10. Reacción de transferencia de electrones de compuesto polifenólico (A) sobre el radicar DPPH.Tomado de la Tesis Efecto del metodo de obtención de sus extractos sobre la composicion y la actividad antioxidante de los mismos.	33
Figura 11. Reacción Folin, Tomado de la Tesis Evaluacion de las propiedades Bioactivas de Mora (<i>Rubus Glaucus</i>) y agraz(<i>Vaccinium meridionales Swarts</i> y adaptado en programa Avogadro	34
Figura 12. Reacción de las antocianinas con bisulfito para formar antocianinas –sinfónicas incoloras. Tomada de la Tesis efectos de la concentracion de la solucion osmotica y tiempo de pre-tratamiento osmotico en el color, contenido de compuestos fenolicos y antocianinas en la mermelada de fresa y adaptado en el programa Avogadro	36
Figura 13. Dispositivo de extracción Soxhlet. Tomado de la tesis. Efectos del tiempo de exposición al ultrasonido y la temperatura a las propiedades fisicoquímicas, contenido de vitamina C y microbiologicas de la pulpa de zarzamora.....	38
Figura 14. Sistema creado para extracción por ultrasonido. Tomado de la tesis. Efectos del tiempo de exposición al ultrasonido y la temperatura a las propiedades fisicoquímicas, contenido de vitamina C y microbiologicas de la pulpa de zarzamora.	40
Figura 15. Formula estructural Cloruro de colina.....	44

Figura 16. Reacción cloruro de colina: urea.....	45
Figura 17. Diagrama del procedimiento de extracción. Fuente propia.	51
Figura 18. Absorbancia vs Tiempo a un pH 1	67
Figura 19 Absorbancia vs Tiempo a un pH 4.5..	67
Figura 20. Curva patrón Trolox y resultados de lectura de las muestras en los dos métodos....	70
Figura 21. Intervalos de comparación entre resultados obtenidos de los extractos bajo el método ABTS con curva patrón de Trolox	72
Figura 22. Curva promedio generada del patrón de cianidinaa-3 glucósido.	74
Figura 23. Identificación de 3 cianidinaa-glucosido en la muestra 3 con solvente eutéctico.....	75
Figura 24. Resumen de los procesos de extracción en A) tiempo, B) gasto d agua y C) gasto de solvente.....	77

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La industria química produce grandes volúmenes de desechos y subproductos siendo fuente importante de contaminación. Ejemplo de ello, son los solventes orgánicos, compuestos orgánicos volátiles que se utilizan solos o en combinación con otros agentes, para disolver materias primas, productos o materiales residuales, los cuales han venido siendo utilizados como agentes de limpieza, modificador de viscosidad, agente tensoactivos, plastificante, conservante o portador de otras sustancias, entre otros, que una vez depositadas quedan fijas y el solvente se evapora; teniendo como resultado una fuente de contaminación ambiental. Si bien es cierto que los solventes orgánicos tales como el diclorometano, acetonitrilo, éter de petróleo, hexano y acetona. entre otros, facilitan el proceso químico las mezclas de reactivos, consecución de concentraciones, control de temperatura de reacción etc., también presentan muchos inconvenientes, como los son el: 1. Impacto tanto a nivel ambiental con la liberación a la atmósfera, causando la degradación de la capa de ozono; 2. Riesgos de toxicidad, incendio o explosión; 3. Vertidos; 4. Uso de cantidades mucho mayores a las del producto. 5. Aumento de costos, riesgos de producción y 6. Requerimiento de una etapa de separación solvente – producto final.

La Química verde ha buscado como uno de sus desafíos más importantes solventes biorenovables, respetuosos con el medio ambiente, no tóxicos y baratos. Para lo cual, ha fijado su mirada en los líquidos iónicos (Li) que ofrecen ventajas en procesos de extracción y preparación de muestras debidos a sus propiedades únicas de (presión de vapor nula, alta estabilidad térmica, entre otras (...)) además de su capacidad de disolver tanto solutos polares como no polares, incrementado su usos como una atractiva alternativa “verde” (Franco-Vega et al. 2014). Sin embargo, el uso de líquidos iónicos como solventes respetuosos con el medio ambiente debe ser

de nuevo evaluado, pues recientemente se ha descrito en la bibliografía la alta toxicidad de algunos y la baja biodegradabilidad, su síntesis se encuentra muy lejos de cumplir los principios de la “Química Verde” pues generalmente requiere el uso de altas cantidades de disolventes y sales con el fin de asegurar el completo intercambio de aniones (Franco-Vega et al. 2014).

Ante esta situación se ha evaluado investigaciones del potencial de los Solventes Eutécticos Naturales Profundos (NADES) los cuales son sales líquidas que se basan generalmente en mezclas de componentes relativamente baratos y fácilmente disponibles que proporcionan una buena perspectiva para un uso más amplio en el campo de la tecnología verde (Bosiljkov and Dujmi 2016).

Ahora bien, actualmente la industria alimentaria se ha visto sujeta a serios cambios debido a que los consumidores están optando por productos más naturales en especial sin colorantes sintéticos, a causa de los efectos perjudiciales para la salud humana. Siendo de gran interés para esta industria las antocianinas, quien representa un grupo amplio de compuestos fenólicos vegetales, estos son los pigmentos hidrosolubles rojos, azules y púrpuras de las flores, frutas y verduras además de poseer como valor agregado su capacidad antioxidante, siendo entre las frutas que caracterizan por su alto contenido de pigmentos naturales antocianínicos la Mora de Castilla (*Rubus Glaucus Benth*). Por lo tanto, la extracción de estos pigmentos puede ayudar a un mejor aprovechamiento para la obtención de productos coloreados con valor agregado para el consumo humano y beneficios terapéuticos dentro de los cuales se pueden encontrar los efectos anticancerígenos, antitumorales, antidiabéticos y antioxidantes.

La obtención de un solvente amigable con el medio ambiente que obtenga resultados mejores o iguales a los solventes convencionales, y que a su vez se utilice como medio de

extracción un método que reduzcan tiempos de procesamientos, costos e insumos, darían opciones a la industria para mejorar sus procesos, este es el objetivo principal de la presente investigación para lo cual, se tomó como análisis la obtención de polifenoles (antocianinas) a partir del fruto de la Mora de Castilla (*Rubus Glaucus Benth*) empleando el Cloruro de Colina: urea como solvente eutécticos naturales profundos (NADES) es una estrategia de extracción de alto rendimiento bajo la técnica de extracción asistida por ultrasonido (EAU).

2. INTRODUCCIÓN

El objetivo principal de este trabajo de investigación fue evaluar la eficiencia como solvente de la mezcla cloruro de Colina: Urea categorizado como Solvente Eutéctico bajo el uso de una técnica de extracción ultrasonido, identificando el analito 3-cianidina- glucósido compuestos antioxidante presente en las Antocianinas de la Mora de Castilla (*Rubus Glaucus Benth*), teniendo como orientación el uso del solvente metanol en una técnica convencional como lo es la extracción Soxhlet. De esta manera, señalar unas condiciones adecuadas para que el solvente eutéctico presente una eficiencia de extracción adecuada y cumpla con los preceptos de la Química Verde.

El desarrollo de esta investigación se determinó bajo cinco (05) etapas así: (1) Preparación del fruto. (2) Obtención de extracto mediante el método alternativo de Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU) comparado con el método tradicional Soxhlet. (3) Evaluación de la actividad antioxidante de cada uno de los extractos por medio de las técnicas ABTS y DPPH. (4) Determinación del Contenido Total de Fenoles (CTF) por medio de las técnicas Folin Ciocalteu y Antocianinas Totales (5) Identificación de polifenoles de los extractos con mayor actividad antioxidante por medio espectroscopia de absorción UV-VIS e identificación del analito 3-cianidina glucósido mediante Cromatografía líquida de Alta Eficacia (HPLC), en el extracto obtenido bajo el solvente Eutéctico.

Es de esta manera, que el uso de técnicas no convencionales de extracción busca mejorar los rendimientos en la extracción del compuesto de interés. En la actualidad la industria de alimentos ha incorporado con bastante éxito estas tecnologías emergentes en aplicaciones

específicas relacionadas con el procesamiento, conservación y extracción de componentes de los alimentos.

Una de estas técnicas es la tecnología de ultrasonido cuya aplicación en el área de la salud ha generado resultados satisfactorios en los sistemas de diagnóstico como los: doppler, ecografías, ecocardiografías y también en sesiones terapéuticas, aprovechando las vibraciones mecánicas y el efector térmico producido; a su vez paso a emplearse con bastante éxito y de manera eficiente en la industria de los alimentos, la razón de su éxito en este campo específico se debe a la efectividad en procesos de congelación, el secado, el blanqueado, la esterilización y la extracción de compuestos de interés (C.N Quiroz-Reyes, M.A. Aguilar –Méndez 2013).

Otro aspecto que se tuvo en cuenta fue el uso de Solventes Eutécticos Profundos (DES) los cuales son una subcategoría de los líquidos iónicos (IL), reportados por primera vez en el 2001 por Abbott et al. El más ampliamente estudiado hasta la fecha es el Cloruro de colina: urea, este tipo de disolvente eutéctico tipo III, también conocido como *Reline*, es una mezcla iónica tratable a temperatura ambiente, con una preparación barata, natural, determinándose en una línea biodegradable de diseño bactericida no citotóxico (Hammond, Bowron, and Edler 2016).

Todo este proceso bajo un objetivo fundamental reducir los daños ambientales que producen el uso de solventes como metanol (solvente tradicional) quien Leiva en su investigación llevada en el año (2009) (Leyva Daniel 2009) sobre “*Determinación de antocianinas, fenoles totales, y actividad antioxidante en licores y fruto de la Mora*”, indico que es el solvente bajo concentración de 0,001 % HCl en metanol, es el método más efectivo para la extracción de compuestos fenólicos.

Otro aspecto de interés es implementar metodologías para el uso de tecnologías alternativas que reducirían en un gran porcentaje los gastos de reactivos y los tiempos de extracción, esto sin disminuir la efectividad de la misma.

Un antecedente de esta investigación fue llevada por parte de (Bosiljkov and Dujmi 2016) quienes para establecer métodos de extracción ecológicos para las antocianinas en la línea de vinos, se investigaron los solventes eutécticos profundos naturales (NADES) como una alternativa verde a los solventes convencionales, junto con la extracción asistida por ultrasonido de alta eficiencia verde a los solventes convencionales, junto con la extracción asistida por ultrasonido de alta eficiencia, en donde se evaluó en NADES a base de Cloruro de Colina: urea con ácido málico como donante de enlace de hidrógeno y el cual fue seleccionado como el más prometedor, lo que proporcionó una extracción más efectiva de antocianinas de líneas de vino en comparación con un solvente convencional. Este enfoque que utilizó el NADES como solvente verde y ultrasonido como fuente de energía alternativa, representa una buena opción para diseñar métodos de extracción ecológicos para compuestos fenólicos en diversas fuentes.

3. MARCO DE REFERENCIA

En este apartado se definen los conceptos más relevantes que se abarcan en el trabajo investigativo y se presentan en el contexto de la literatura científica actual. Entre dichos conceptos se encuentra el fruto de la Mora, los compuestos polifénolicos, entre los cuales se destacan aquellos que hacen parte de la composición de dicho fruto, las propiedades bioactivas de estos compuestos, resaltando la actividad antioxidante y las estrategias para su medición, técnicas de extracción, obtención de compuestos y el uso de las mezclas eutécticas profundas empleadas para tal fin.

3.1 Mora de Castilla (*Rubus Glaucus Benth*)

La Mora de Castilla es una especie perteneciente a la familia *Rosácea*, descubierta por Hart y descrita por Benth, originaria de las zonas altas tropicales de América principalmente de Colombia, Ecuador, Panamá, Guatemala, México y Salvador (Chancusig 2012). Se trata de una planta semi-recta con tallos redondeados, de hasta 5 metros de largo, con hojas trifoliadas, de peciolo cilíndricos y blancuzcos, acuminados provistos de espinas que también se hallan en los nervios de la cara inferior de la hoja. Las flores se caracterizan por tener 2 cm de diámetro, poseer cinco sépalos largos y persistentes, corola de cinco pétalos blancos, estambres numerosos y separados, las cuales aparecen sobre un receptáculo convexo llamado drupa o drupela (Chancusig, 2012). Por otra parte, el fruto de Mora es un aquenio observable en la figura 1. Fruto de Mora de Castilla (*Rubus Glaucus Benth*). Adaptado del Boletín mensual. DANE (2013), conformando por diminutas drupas unidas al receptáculo desarrollado y carnoso, su color cambia de rojo a negro brillante conforme a su desarrollo, el peso del fruto esta entre 3 a 5 gramos, de consistencia dura y sabor agridulce tierno a dulce (maduro), su pulpa es rojiza y allí se encuentran las semillas en número de 100 a 120. El fruto es altamente perecedero por lo que debe hacerse la cosecha una vez

que el fruto ha llegado a su madurez comercial con suficiente dureza y contextura que eviten que el producto se deteriore; la semilla de la Mora presenta altos contenidos de aceite oleico, linoleico y palmítico que previenen enfermedades del corazón, contiene además un alto contenido de antocianinas y carotenoides (antioxidantes), vitamina C y fibra que previene la degeneración. (Sanchez León 2012)



Figura 1. Tomada de boletín mensual. El cultivo de la mora de Castilla (Rubus Glaucus Benth) frutal de clima frio moderado, con propiedades curativas para la salud humana. Dane.2013

El fruto de la Mora es rico en vitaminas C, E y hierro asimilable, además de tener una buena cantidad de pectina, también es muy rico en ácidos orgánicos como el cítrico y málico que aportan un sabor ligeramente ácido, tienen una gran cantidad de fibra. Estos y otros componentes se observan en la tabla 1 correspondiente a la composición nutricional. Adaptada de (Sanchez León 2012).

Tabla 1. Composición nutricional de la Mora de Castilla (Rubus Glaucus Benth). Adaptada del Estudio Potencial Antioxidante de la Mora de Castilla. (León, 2012).

Nutriente	mg 100 g ⁻¹
Ácido ascórbico	8
Calcio	42
Carbohidratos	5600
Cenizas	400
Fibra	500
Fosforo	10

Grasa	100
Hierro	1,7
Niacina	0,3
Proteínas	600
Robo flavina	0,05
Tiamina	0,02

Adicionalmente, el fruto de la Mora se caracteriza por no ser climatérico, es decir, la Mora no sigue madurando después de la cosecha. Aunque puede haber cambios de coloración, los contenidos de azúcares, el sabor y la tasa respiratoria se mantienen constantes. Por tanto, los frutos que se colectan inmaduros no alcanzan el desarrollo pleno de sus características organolépticas, mientras que los frutos recolectados sobre maduros tendrán una vida postcosecha corta, obligando a una comercialización pronta (Sanchez León 2012).

En la literatura han sido descritos diversos compuestos bioactivos en la Mora, particularmente polifenoles, por lo que a continuación se exponen las generalidades sobre la clasificación, estructura y propiedades de estos compuestos. Adicionalmente, se señalan y describen los polifenoles presentes en el fruto de la Mora de Castilla.

3.2 Compuestos Polifénolicos

Los polifenoles son un amplio y diverso conjunto de compuestos que desempeñan un papel protector en plantas. Se trata de una vasta familia de compuestos biogenerados por las rutas de shikimato/fenilpropanoides y/o de los policétidos acetato/malonato. Estructuralmente los polifenoles se caracterizan por tener varios grupos hidroxilos fenólicos en varios anillos aromáticos del 1 al 7. Estos compuestos han sido empleados como ingredientes funcionales de alimentos y cosméticos. En la figura 2, se observa la clasificación de los polifenoles. Tomado y adaptado por Maquilón 2014(Ferrazzano et al. 2011) con algunos ejemplos representativos así:

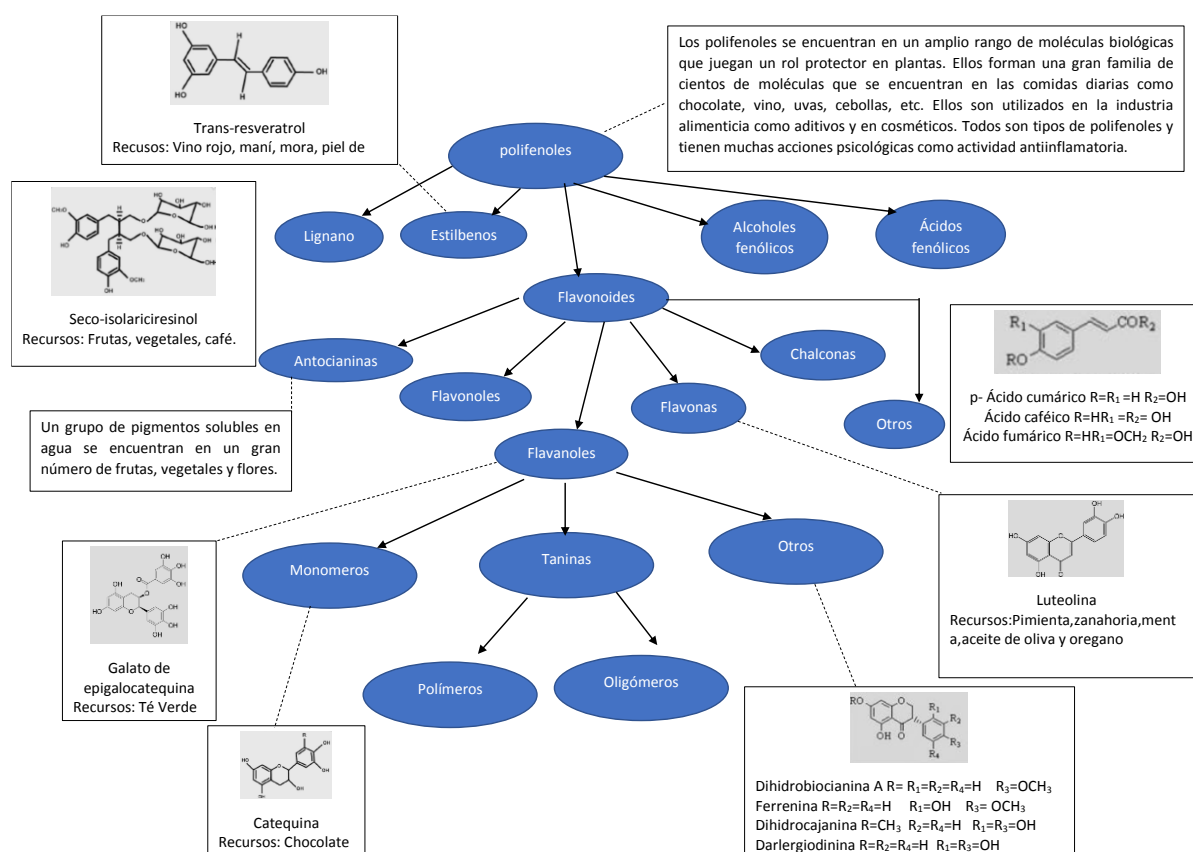


Figura 2. Clasificación de los polifenoles y algunos ejemplos representativos. Tomado y adaptado de (Maquilón Albaladejo 2014)(Maquilón Albaladejo 2014)(Maquilón Albaladejo 2014)(Maquilón Albaladejo 2014)(Maquilón Albaladejo 2014)

Dado que, en el fruto de la Mora presenta entre sus principales compuestos polifénolicos los flavonoides, a continuación, se profundiza en estos y sus propiedades así:

3.3 Aspectos estructurales y propiedades de los flavonoides

Esta clase de compuestos se caracteriza por tener una estructura benzo- γ -pirano $C_6-C_3-C_6$ figura 3. Estructura básica de los flavonoides tomada de la tesis Análisis Químico de Antocianinas en Frutos Silvestres (2012), los cuales pueden existir como agliconas libres o en forma glicosidada (Cartaya and Reynaldo 2001)

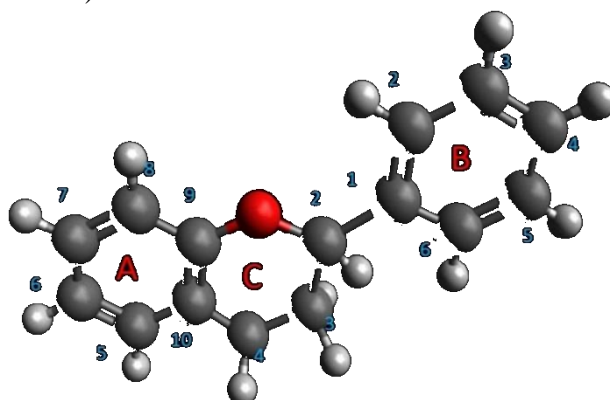


Figura 3. Estructura Básica del flavonoide. Adaptado de la Tesis Análisis Químico de Antocianinas en Frutos Silvestres Colombianos. Universidad Nacional (2011) en programa Avogadro.

Varios subgrupos de flavonoides son clasificados de acuerdo con la sustitución del anillo denominado en la figura 3 como C. En esta clasificación son de suma importancia el estado de oxidación del anillo heterocíclico y la posición del anillo denominado B. Algunos ejemplos de estos subgrupos se pueden observar en la figura 4, donde se observan las estructuras básicas de los subgrupos de los flavonoides. Tomada y adaptada de la tesis “Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres colombianos” así:

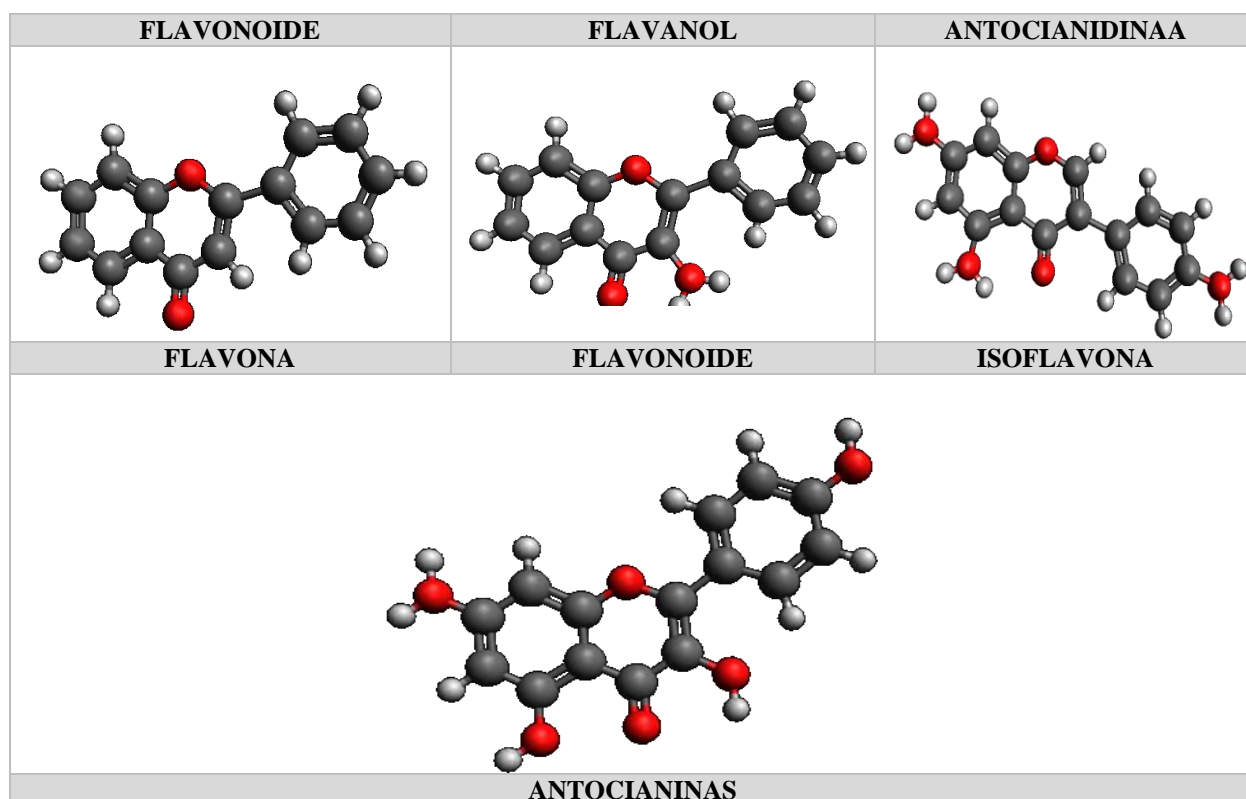


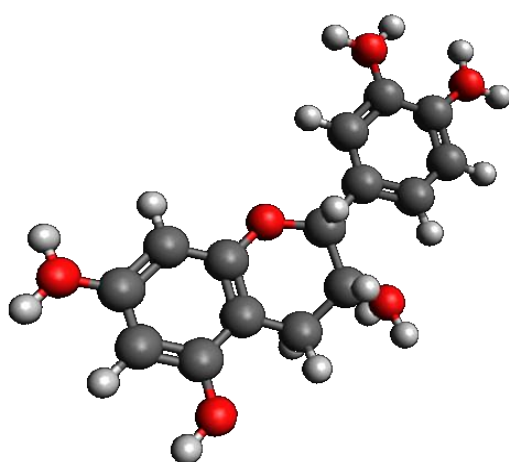
Figura 4. Estructuras básicas de los subgrupos de los flavonoides. Adaptado de la Tesis Análisis Químico de Antocianinas en Frutos Silvestres Colombianos. Universidad Nacional (2011) en programa Avogadro.

En el fruto de la Mora se han identificado diversos flavonoides, particularmente antocianinas, flavan-3-oles y proantocianidinaas, cuyo perfil varía en función de la naturaleza del cultivo, la ubicación geográfica y las condiciones de post-cosecha. Asimismo, se han encontrado en el fruto derivados de ácidos hidroxibenzóico e hidroxicianimicos (Sanchez León 2012). A continuación, se describen los tipos de flavonoides encontrados en el fruto de la Mora de Castilla, así:

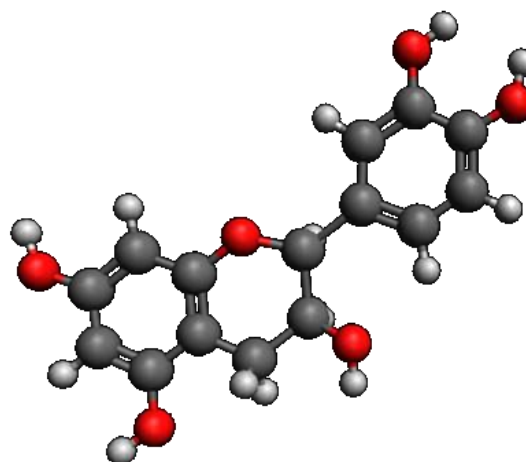
3.3.1 Flavan-3-oles

Representan la subclase de flavonoides estructuralmente más complejas y desde los monómeros simples (+) – catequina y su isómero (–) – epicatequina. Figura 5. Estructuras

químicas de los principales flavonoles, tomado y adaptado de la Tesis “*Análisis Químico de Antocianinas en Frutos Silvestres Colombiano*”. Universidad Nacional de Colombia (2011). Se encuentran abundantemente en las frutas como albaricoque (*Prunus armeniaca*) las guindas (*Prunus cerasus*), las uvas y moras (*Rubus spp.*), siendo uno de los ingredientes funcionales en diversas bebidas, alimentos integrales y procesados, hierbas medicinales y suplementos consumidos en la región de América y muy probablemente en la dieta occidental. Su presencia en los alimentos afecta diferentes parámetros de calidad tales como: astringencia, amargura, acidez, dulzor, viscosidad salival, aroma, y color. (Carmen Menéndez Soriano 2012)



(-)-EPICATEQUINA



(+)- CATEQUINA

Figura 5. Estructuras químicas de los principales flavonoles de la dieta. Adaptado de la Tesis *Análisis Químico de Antocianinas en Frutos Silvestres Colombianos*. Universidad Nacional (2011) en programa Avogadro.

3.3.2 Proantocianidinas

Son polímeros de flavan-3-oles, también conocidos como “taninos condensados” dotados de potentes propiedades antioxidantes. Se encuentran en concentraciones elevadas en arándanos, las semillas y la piel de las uvas, la corteza del pino y entre otras muchas plantas. Constituyen el

producto final de la vía biosintética de los flavonoides y se metaboliza a antocianinas, de la misma manera que los polisacáridos se metabolizan a unidades más simples de azúcares.(Arévalo Peñaranda et al. 2011).

Las proantocianidinaas poseen propiedades antibacterianas, así como la propiedad de inhibir la adhesión de las bacterias y las mucosas de las vías urinarias, además reducen el riesgo de enfermedades coronarias al mantener la permeabilidad vascular, evitando las lesiones de los radicales libres sobre las paredes de las arterias(Arévalo Peñaranda et al. 2011).

Se diferencian estructuralmente de acuerdo con el número de grupos hidroxilos, su posición en los anillos aromáticos y su configuración espacial en las unidades de flavonoles constituyentes. Los polímeros pueden presentar una estructura homogénea constituida únicamente por unidades de un único flavanol o presentar una composición mixta con distintas unidades monoméricas siendo las procianidinaas (polímeros homogéneos de (*epi*) catequina) mayoritarias respecto a otras proantocianidinaas en el reino vegetal. (Juana and Roa 2012).

La gran cantidad de grupos hidroxilo que posee estos compuestos hace que presenten gran reactividad con otras moléculas, en particular presentan una alta afinidad por las proteínas. Esta reactividad viene determinada por el grado de polimerización de compuestos, tipos de enlaces interflavánicos y patrón de hidroxilación ejemplo de ello se encuentra la figura 6. Tanino condensado. Tomada y adaptado de la Tesis “*Análisis Químico de Antocianinas en Frutos Silvestres Colombianos*”. Universidad Nacional (2011). Es necesario conocer estas diferencias para entender que efectos biológicos que pueden tener y cómo pueden afectar el metabolismo.

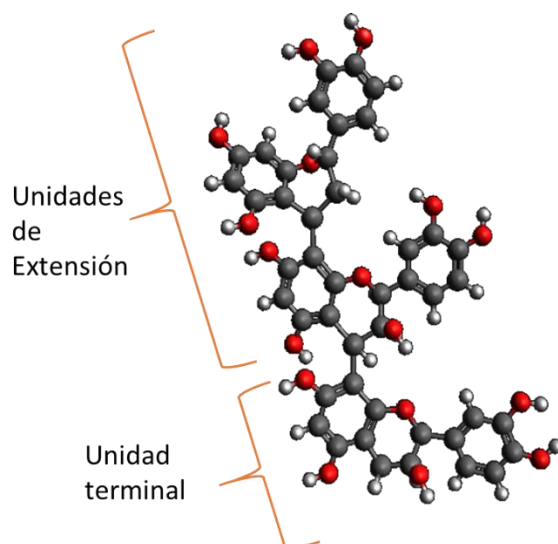


Figura 6. Ejemplo de tanino condensado. Adaptado de la Tesis *Análisis Químico de Antocianinas en Frutos Silvestres Colombianos*. Universidad Nacional (2011) en programa Avogadro.

3.4 Antocianinas

Son un subgrupo de los flavonoides que se encuentra comúnmente en la naturaleza, hidrosolubles y constituyen unos de los grupos más importantes de los pigmentos vegetales, cuenta con una estructura como se puede observar en la figura 7. Estructura molecular de la Antocianina. Tomado y adaptado de la Tesis “*Análisis Químico de Antocianinas en Frutos Silvestres Colombianos*”. Universidad Nacional (2011) con glicósidos de antocianidinaas altamente reactivas y por lo tanto sensibles a las reacciones de degradación. Varios factores tales como el oxígeno, la temperatura, la luz, las enzimas, y el pH, afectan la química la antocianina y consecuentemente su estabilidad y color. El azúcar presente en las moléculas les confiere una gran solubilidad y estabilidad, generalmente se une a la antocianidinaa en la posición 3 del grupo fenólico, pero puede también hacerlo en las posiciones 5 y 7 observables en la figura 7. Con base en el número de azúcares presentes en su estructura, las antocianinas se clasifican en: monoglucósidas, diglucósidas, triglucósidos. Los tipos de azúcares presentes pueden ser: monosacáridos,

disacáridos o trisacáridos. Los monosacáridos más comunes son: pentosa como arabinosa y xilosa, o bien hexosas de las cuales la D-glucosa es la más frecuente, aunque también pueden estar presentes galactosa o ramosa. La degradación de antocianinas puede ocurrir durante su extracción, procesamiento de alimentos y el almacenamiento (Juana and Roa 2012).

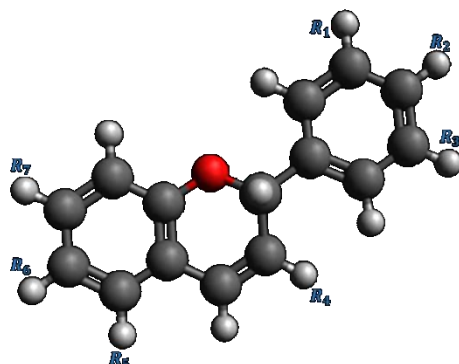
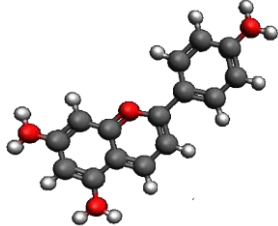
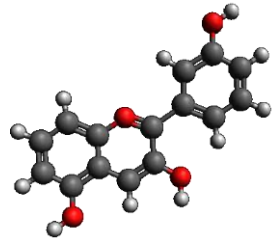
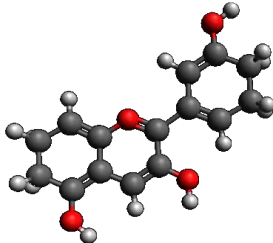
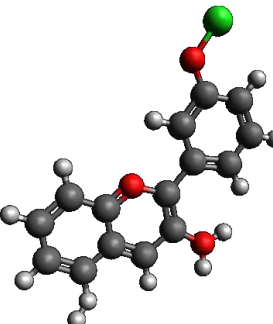
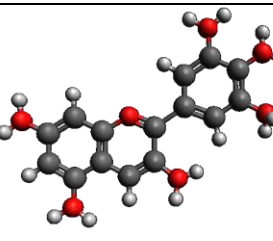
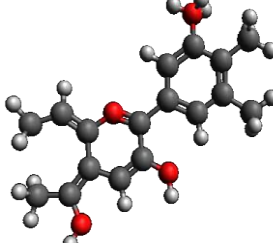


Figura 7. Estructura antocianina. Adaptado de la Tesis *Análisis Químico de Antocianinas en Frutos Silvestres Colombianos*. Universidad Nacional (2011) en programa Avogadro

Las antocianinas más comúnmente conocidas se basan en seis (6) antocianidinaas: cianidinaa, delphinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina y petunidina además de otras 539 reportadas al aislarse en la planta (Castaño and Espinosa 2016) como se puede observar en la tabla 2. Las antocianinas más comúnmente conocidas. Tomado y adaptado de la Tesis “*Análisis Químico de Antocianinas en Frutos Silvestres Colombianos*”. Universidad Nacional (2011).

Tabla 2. Antocianinas más comúnmente conocidas Adaptado de la Tesis *Análisis Químico de Antocianinas en Frutos Silvestres Colombianos*. Universidad Nacional (2011)

ANTOCIANINAS	R ₁	R ₂	ESPECTRO VISIBLE λ MAX (nm)	ESTRUCTURA
pelargonidina	H	H	494 Naranja	

cianidinaa	OH	H	506 (naranja –rojo)	
delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)	
peonidina	OCH_3	H	506 (Naranja-Rojo)	
petunidina	OCH_3	OH	508 (Azul-rojo)	
malvidina	OCH_3	OCH_3	510 (Azul-rojo)	

Las antocianinas se encuentran abundantemente en las bayas, donde proporcionan a las frutas sus característicos colores. Los arándanos (*Vaccinium macrocarpon*), la mora y el sauco

(*Sambucus nigra*) contiene derivados de un solo tipo de las antocianinas (la cianidinaa), en las bayas se han encontrado varias de estas sustancias; en el caso de la *Rubus Glaucus Benth*, están presentes algunas antocianinas como: cianidinaa y pelargonidina, siendo una de las más abundantes la ciadina-3-glucósido, en donde diversos estudios reportan que su contenido va de 10 a 600 mg /100g de peso en fruto fresco. En la tabla 3 se muestras las Antocianinas identificadas en la Tesis Doctoral. *Efectos vasculares de la quecertina (...)* (2012). presentes en el fruto de la Mora de Castilla

Tabla 3. Antocianidinaas identificadas en estudio para *Rubus Glaucus Benth*. Adaptado de la Tesis Doctoral. *Efectos vasculares de la quecertina: interacciones y papel de los procesos de conjugación y desconjugación metabólica* (2012)

Nombre botánico	Identificación
Rubus Glaucus Beth	Cianidinaa -3- glucósido y cianidinaa-3-rútinósido
	Cianidinaa-3-sambubiosido, cianidinaa-3-glucósido; cianidinaa-3-xilosilo rutinósido; cianidinaa-3-rutinósido; pelargonidina -3-glucósido y pelargonidina-3-rutinósido.
	Cianidinaa-3-glucósido; cianidinaa-3-rutinósido, pelarognidin-3-rutinósido y glicósidos cianidinaa.

Los flavonoides son sustancias fundamentales para el desarrollo normal de las plantas y dentro de la célula vegetal se encuentran en los cloroplastos. Las funciones de los flavonoides en las plantas están relacionadas con defensa y señalización química (Cartaya and Reynaldo 2001). Dichas funciones están relacionadas con su capacidad química para que los metales, catalicen el transporte electrónico y el secuestro de radicales libres. Además, los flavonoides inhiben una numerosa variedad de enzimas, tales como hidrolasas, liasas, trasnferasas, hidroxilasas, oxidoreductasas y quinasas. *Transferasas*: catecol o metiltransferasa. Debido a esta bioactividad, los flavonoides han sido estudiados como potenciales agentes funcionales en las industrias

alimentaria, farmacéutica y cosmética. Entre las bioactividades más notorias de los flavonoides se encuentran: la actividad antioxidante, actividad antiinflamatoria, actividad bactericida, actividad anti-cáncer, actividad hepatoprotectora, entre otros. (Cartaya and Reynaldo 2001).

En el fruto de la Mora uno de los flavonoides más interesantes es el Cianidin-3-*O*-glucósido, dadas sus propiedades bioactivas, por lo que dicho compuesto ha sido elegido como “objetivo” en el presente trabajo de investigación. En el siguiente apartado se exponen algunas de las características estructurales y bioactivas del Cianidin-3-*O*-glucosido.

3.4.1 Cianidin-3-*O*-glucosido (C₃G)

El C₃G es un pigmento de tono oscuro presente en frutas, verduras y flores, cuya estructura se observa en la figura 8. Cianidina 3- Glucósido. Adaptado de la Tesis Evaluación de las propiedades bioactivas de mora y agraz. Universidad Nacional de Colombia (2012)

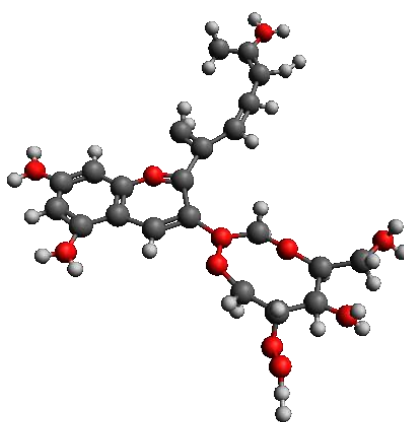


Figura 8. Cianidina-3-Glucosido (Bernal, 2012). Adaptado de la Tesis Evaluación de las Propiedades bioactivas de Mora (Rubus Glaucus) y Agraz (Vaccinium meridionales Swartz), en fresco y durante proceso de transformación. Universidad Nacional de Colombia (2012) en programa Avogadro.

Se ha informado sobre la bioactividad de este compuesto, como se resume en la tabla 4 así:

Tabla 4. Propiedades de la Mora de Castilla aplicadas en el ser humano

PROPIEDADES	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
ANTIOXIDANTE	Su contenido rico en antioxidantes ayuda al cuerpo a neutralizar la acumulación de radicales libres que se desarrollan cuando el oxígeno puede interactuar con moléculas específicas. Con esto, se minimiza el riesgo de enfermedades graves como cáncer y enfermedades del corazón.	(Llerena Silva 2014)
PREVIENE ASCLEROSIS	Esta condición se relaciona con la acumulación de placa en la pared arterial, lo cual impide el flujo sanguíneo adecuado a través del organismo. Si las paredes de las arterias están restringidas demasiado debido a la placa dura, esto aumenta el riesgo de sufrir un ataque cardíaco y es ahí donde entra a jugar este compuesto.	(Juana and Roa 2012)
REGULADOR DE DIABETES	Tiene la capacidad de ayudar a los que sufren de diabetes tipo 2, debido a su capacidad para aumentar la sensibilidad a la insulina y reducir los niveles de glucosa.	(Arévalo Peñaranda et al. 2011)
ANTI-INFLAMATORIO	La suplementación puede ayudar a aumentar la capacidad del cuerpo para combatir la inflamación, lo que tiene el efecto negativo de causar enfermedades graves o incluso acelerar el proceso de recuperación muscular en el post entreno.	(Juana and Roa 2012)
PRECURSOR DE SALUD OCULAR	Este compuesto vegetal tiene la capacidad de regenerar la rodopsina, que es esencial para permitir que la retina absorba la luz. Un beneficio de esto es la capacidad de mejorar la visión nocturna; además, se cree que el contenido rico en antioxidantes tiene un efecto positivo de ralentizar el desarrollo de enfermedades oculares relacionadas con la edad, como la degeneración ocular.	(Pilar Rojas-Llanes, Martínez, and Stashenko 2014)
REDUCTOR DE GRASA		(Juana and Roa 2012)

	El compuesto tiene la capacidad de mejorar la sensibilidad a la insulina, que es útil para proporcionar más calorías y proteínas de carbohidratos a las células musculares.	
--	---	--

Con el objetivo de conocer los conceptos de la metodología establecida en el presente proyecto se explicará en detalles cada uno de sus variables, para lo cual se dará de inicio con la actividad antioxidante en los extractos de Mora, de aspectos fundamentales de este trabajo para su evaluación.

3.5 Métodos para evaluar la actividad antioxidante, el contenido total de fenoles y el contenido total de antocianinas

Los métodos para evaluar la actividad antioxidante pueden dividirse en dos categorías: los métodos de transferencia de un átomo de hidrógeno y ensayos basados en la transferencia de electrones. (Leyva Daniel 2009)

Los métodos de transferencia de un átomo de hidrógeno están basados en reacciones donde el antioxidante y el sustrato compiten por el radical libre sintético, una molécula oxidable y un antioxidante. (Leyva Daniel 2009)

Los métodos basados en transferencia de un electrón involucra una reacción de oxidación con el oxidante que es un indicador del punto final de la misma (Leyva Daniel 2009), tabla.5.

Tabla 5. Clasificación de los métodos para evaluar la actividad antioxidante de acuerdo con las reacciones involucradas. Tomada de la tesis *Determinación de Antocianinas, fenoles Totales y actividad antioxidante en licores y frutos de mora*. Universidad Tecnológica de la Mixteca (2009).

MECANISMOS	MÉTODO
Transferencia de Hidrogeno	TRAP (Capacidad Antioxidante Total)

	ORAC (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno)
	Inhibición de la oxidación de LDL (lipoproteína de baja densidad)
Tranferencia de un electrón	TEAC (Capacidad antioxidante equivalente al Trolox)
	ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico).
	FRAP (Poder de Reducción Antioxidante del ión férrico)
	DPPH (1,1-difenil 2-picrilhidracil)

En el presente estudio la cuantificación de la actividad antioxidante se realizó de acuerdo con los métodos ABTS y DPPH por lo que sus fundamentos químicos se presentan en detalle así:

3.5.1 ABTS (ácido 2,2'-azinobis(6-sulfonato-3-etilbenzotiazolina)

El compuesto cromógeno ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) presenta un color azul verdoso, es soluble en agua y disolventes orgánicos y químicamente estable. Al reaccionar el ABTS con persulfato de potasio se genera el radical catiónico $ABTS^+$, en presencia de un antioxidante se inhibe la formación del radical que se traduce en una pérdida de la coloración verde azulada y se determina la reducción de la absorbancia a 734 nm (figura 9). El método es estable, reproducible y puede usarse en medios acuosos y grasos. Como desventajas, algunas reacciones requieren más tiempo para alcanzar su estado estacionario y éste no representa una fuente fisiológica (el radical $ABTS^+$ no se encuentra en el organismo). (Sanchez León 2012).

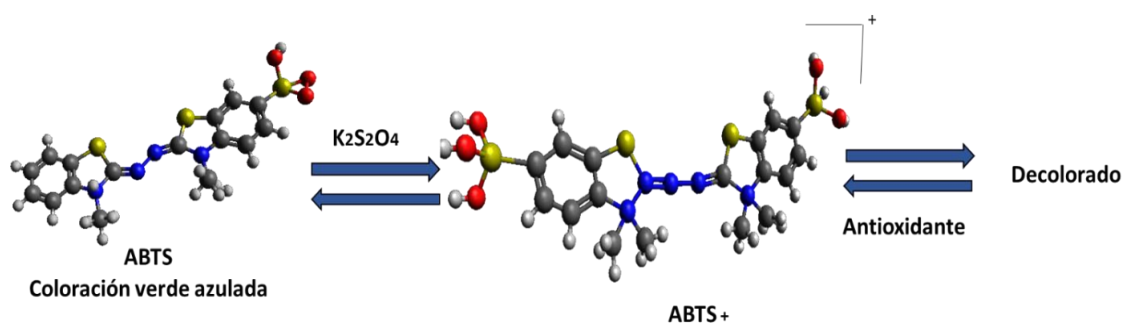


Figura 9. Reacción de formación de radical ABTS $^+$ e interacción de éste con el antioxidante natural de los alimentos. Tomado de (Sánchez León 2012) adaptado en programa Avogadro.

3.5.2 DPPH: (2,2 –difetil-1-picrilhidracilo)

La eficiencia anti radical se mide mediante este método, el cual se basa en la reducción del radical DPPH (1,1-Difenil-2-picrilhidrazil) de color violeta que se torna amarillo a su contacto con los antioxidantes (figura 10). Es un ensayo sencillo y no se necesita generar el radical, ya que el DPPH se comercializa como tal. El radical solamente se puede disolver en medio orgánico, particularmente en metanol. (Vásquez Carreño 2012).

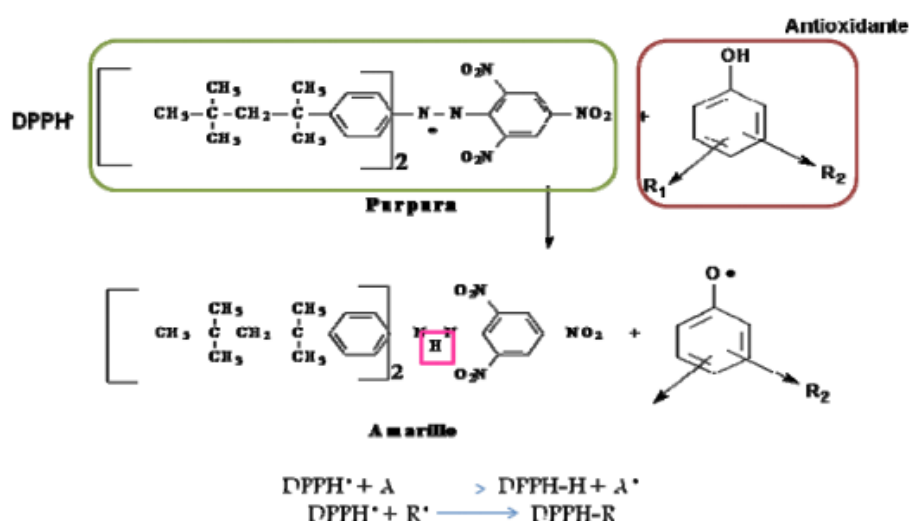


Figura 10. Reacción de transferencia de electrones del compuesto poli fenólicos (A) sobre el radical DPPH. Tomado la Tesis. Efecto del método de obtención de sus extractos sobre la composición y la actividad antioxidante de los mismos. Universidad Nacional de Colombia (Vásquez Carreño 2012)

3.6 Contenido de fenoles y de antocianinas

La actividad antioxidante y el potencial bioactivos también se ha relacionado con el contenido de fenoles y el de antocianinas en fruto como el de la Mora, por esta razón es fundamental evaluar estas variables. A continuación, se exponen los fundamentos para su evaluación.

3.6.1 Ensayo Folin –Ciocalteu (FC)

Consistente en que los compuestos fenólicos de la muestra se oxida por el Reactivo Folin Ciocalteu, el cual está formado por mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3HW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) que se reduce por acción de los fenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y de Molibdeno (Mo_8O_{23}). La oxidación de los fenoles presentes en la muestra causa la aparición de una coloración azul, cuantificándose por espectrometría UV-visible con base a una curva patrón de ácido gálico o catequina (Leyva Daniel 2009).

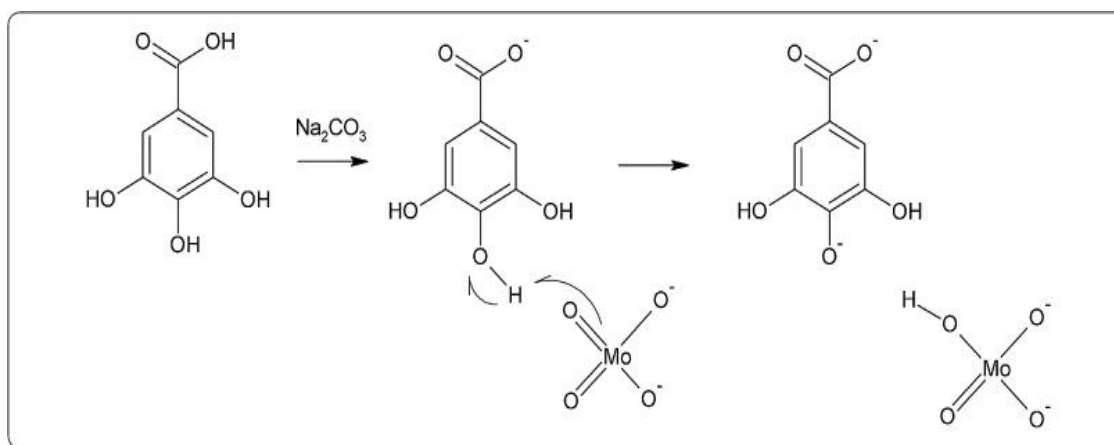


Figura 11. Reacción Folin. Tomado de la Tesis Evaluación de las propiedades Bioactivas de Mora (*Rubus Glaucus*) y agraz (*Vaccinium meridionales Swartz* (Bernal, 2012) y adaptado en programa Avogadro.

3.6.2 Cuantificación de antocianinas

Las antocianinas son moléculas polares y consecuentemente son más solubles en solventes polares que en no polares. A valores de pH donde las moléculas de antocianinas están no ionizadas, pueden ser solubles en éter y no son estables en soluciones neutras y alcalinas, por tanto, los métodos convencionales empleados para la extracción de antocianinas implica el uso de solventes ácidos. (Llama et al. 2015).

Tabla 6. Métodos de extracción de antocianinas Tomado y adaptado de la Tesis Determinación de Antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante en licores y fruto de mora (2009)

MÉTODO	CARACTERÍSTICAS
0,001 % HCl en metanol	Este es el método más efectivo, pero el HCl corrosivo y el metanol tiene efectos tóxicos en la salud humana.
0,001% HCl en etanol	80% tan efectivo como metanol
0,001% HCl en agua	27% tan efectivo como el metanol
Metanol acidificado con ácido cítrico	Este es el más eficiente de los ácidos orgánicos
Agua acidificada con ácido acético	En eficiencia es seguido por el ácido cítrico, tartárico y clorhídrico
Agua con 1000 ppm de SO_2	La extracción es mejor obtenida por el uso de la extracción tradicional los cuales implica sistema de etanol: ácido acético: agua

Como se observa en la tabla 6. Métodos de extracción de antocianinas adaptado del “*Estudio de determinación de Antocianinas, fenoles, totales y actividad antioxidante en licores y fruto de Mora*”, los métodos de extracción han ido en busca de mejores rendimientos, pero se encuentran involucrados aspectos de seguridad ambientales. Dando continuidad con lo expuesto para el estudio en mención, el análisis con mejores resultados en la extracción de antocianinas fue la realizada bajo la concentración de 0,001% HCl en metanol, obteniendo un rendimiento del 80% de efectividad; situación que no paso con las mismas consideración con el uso del solvente etanol, siendo el metanol el más efectivo en este tipo de extracciones. (Leyva Daniel 2009). Situación por

la cual para el desarrollo de la investigación, se tomará como guía de resultados la concentración de 0,001% HCl en metanol, con el fin de determinar la efectividad de la extracción con el solvente (DES) Cloruro de Colina: urea.

Al igual es necesario considerar el pH como uno de los principales factores del medio que afecta la estabilidad del color de las antocianinas, los espectros de UV-visible a diferentes valores de pH también varían y nos ayudan a determinar si las antocianinas están o no polimerizadas. La concentración de antocianinas se determina con la absorbancia a un pH diferencial. El método de pH –diferencial propuesto, permite la estimación alternativa del contenido de antocianinas totales, incluso en la presencia de pigmentos polimerizados y otras interferencias mediante el uso de sistemas de tampón el empleo de un agente blanqueador, bisulfito y la mediación por espectroscopia de UV-visible observable la reacción en la figura 12. Reacción de las antocianinas con bisulfito para formar antocianinas –sinfónicas incoloras en donde los agentes blanqueadores más empleados son sulfito de sodio y peróxido de hidrógeno.

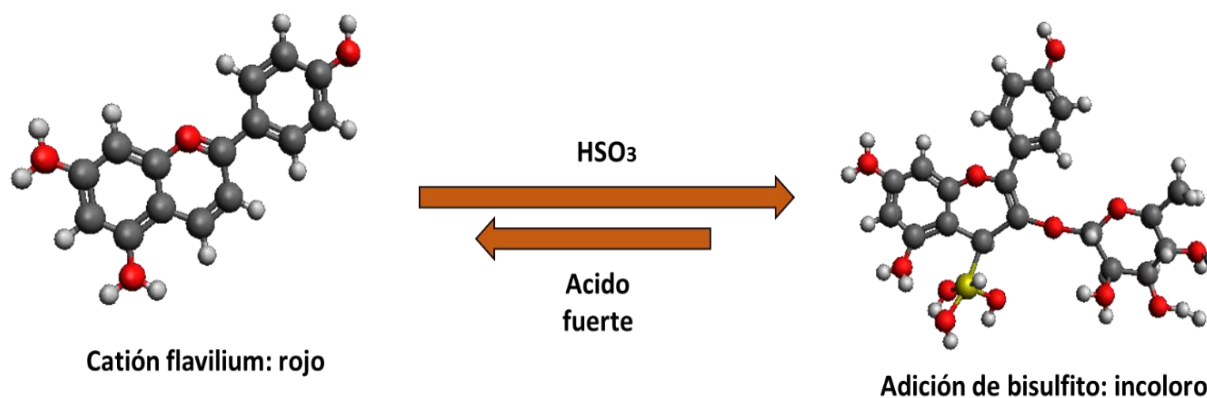


Figura 12. Reacci3n de las antocianinas con bisulfito para formar antocianinas –sinf3nicas incoloras Tomada de la Tesis efectos de la concentraci3n de la soluci3n osm3tica y tiempo del pre-tratamiento osm3tico en el color, contenido de compuestos fen3licos y antocianinas en la mermelada de fresa. (Valeriano Valverde , 2014) y adaptado en programa Avogadro.

La obtención de compuestos polifenólicos con actividad antioxidante implica el uso de técnicas de extracción y de disolventes apropiados que garanticen la seguridad del proceso, del usuario, del ambiente y la calidad del extracto. A continuación, se exponen las generalidades sobre las técnicas de extracción y los disolventes empleados en la presente investigación así:

3.7 Técnicas de extracción y disolventes

Las extracciones envuelven la separación de los compuestos de interés que se desean cuantificar, analizar, o bien purificar, separándolos de aquellos presentes en la matriz de la muestra que no resulten de interés, a partir de la utilización de un disolvente seleccionado y de un proceso de extracción adecuado. En cada extracción se obtiene un complejo o sistema de sustancias activas que puede contener sustancias lastres de diferente procedencia, lo que hace necesario optimizar las condiciones para maximizar la extracción de los compuestos de interés y minimizar los restantes (Mera Morillo, 2015). En los últimos años se ha desarrollado distintas técnicas de extracción, como la extracción mediante fluidos supercríticos, la extracción asistida por ultrasonido, la extracción mediante fluidos presurizados o la extracción asistida por microondas para acelerar el proceso de extracción de compuestos de interés biológico en matrices vegetales, tanto con fines analíticos como con fines industriales. Las técnicas de extracción de compuestos de interés en matrices vegetales con disolventes se basan en la correcta selección del disolvente acoplado al uso de condiciones óptimas de temperatura, presión, agitación, potencia, entre otros. (Mera Morillo, 2015). Para esta investigación se emplearon las técnicas de extracción Soxhlet y extracción asistida por ultrasonido, por lo que se presentan a continuación en concepto general así:

3.7.1 Extracción Soxhlet:

Es una extracción semi continua con un disolvente orgánico. En este método el disolvente se calienta, se volatiliza y condensa goteando sobre la muestra la cual queda sumergida en el solvente. Posteriormente éste es sifonado al matraz de calentamiento para empezar de nuevo el proceso. En la extracción con el equipo Soxhlet se debe tener en cuenta la selección del solvente, conveniente de tal forma que ofrezca el mejor balance como alto límite de saturación, capacidad para producir el material extraído, estabilidad química en las condiciones de proceso, baja viscosidad, baja presión de vapor, baja toxicidad e inflamabilidad, baja densidad, baja tensión superficial, facilidad y economía de recuperación con bajo costo (Mera Morillo, 2015). El dispositivo Soxhlet se puede observar en la figura 13.

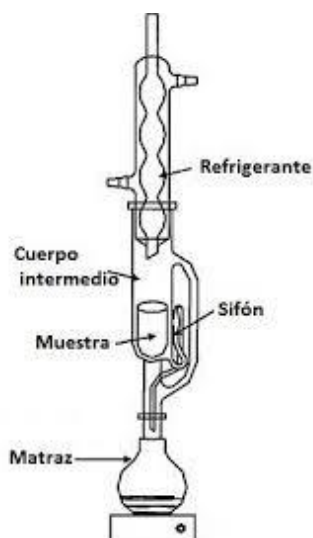


Figura 13. Dispositivo de Extracción Soxhlet. Tomado de la tesis. Efectos del tiempo de exposición al ultrasonido y la temperatura a las propiedades fisicoquímicas, contenido de vitamina C y microbiológicas de la pulpa de zarzamora. Universidad privada Antenor Orrego. Perú. 2019

Algunas de las desventajas de la extracción Soxhlet se señalan a continuación:

- ❖ Es un proceso lento e imposible de acelerar.

- ❖ Los disolventes empleados suelen ser sustancias orgánicas tóxicas como metanol, cloroformo, diclorometano, éter de petróleo, entre otros.
- ❖ Se requiere gran cantidad de disolvente.
- ❖ Inaplicable a analito termolábiles, que se descompongan con el calor o reaccionen.
- ❖ Necesidad de etapa final de evaporación.
- ❖ El método no depende de la matriz.

3.7.2 Extracción asistida por Ultrasonido:

El ultrasonido son ondas que se transmiten por el material con el que están en contacto, provocando su contracción y posterior expansión, en consecuencia, la transmisión de la energía por el material. La extracción asistida por ultrasonido es una de las técnicas más versátil por su simplicidad, bajo costo y por su amplio campo de aplicación. En el caso de la Mora de Castilla (*Rubus Glaucus Benth*) se emplean disolventes líquidos y una matriz sólida (fruto). Las ventajas de la optimización de un procedimiento de extracción mediante el empleo de ultrasonido son el aumento del rendimiento de extracción, con una cinética más rápida, lo que conlleva a menores tiempos de extracción y menor consumo de disolvente que las técnicas convencionales. En resumen, esta técnica con lleva a un ahorro, tanto de solvente, cantidad de muestra y de tiempo (Mera Morillo, 2015)

La aplicación del ultrasonido en un medio líquido genera el fenómeno de la cavitación, este es un proceso que ocurre en dos etapas: en una primera, se produce una descompresión del líquido dejando numerosos huecos. En la segunda, esta descompresión produce un gran aumento de presión que hace que vuelva al estado inicial (líquido) liberando energía, que de nuevo permite que se vuelva a producir una descompresión y así cerrar el ciclo. Por tanto, la extracción se ve

favorecida y acelerada gracias a esta energía liberada. El efecto mecánico que el ultrasonido proporciona permite una mayor penetración del disolvente en el material intracelular y mejoran la transferencia de masa, logrando la ruptura de las paredes de las células y facilitando la liberación de los analitos contenidos en ellas, mejorando de esta manera la extracción. Figura 14. Sistema de Extracción por ultrasonido(Mera Morillo, 2015).

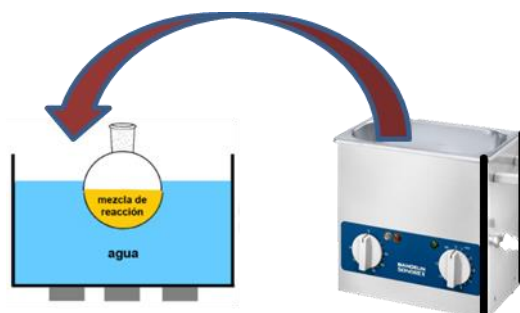


Figura 14. Sistema creado para extracción por ultrasonido. Tomado de la tesis. Efectos del tiempo de exposición al ultrasonido y la temperatura a las propiedades fisicoquímicas, contenido en vitamina C y microbiología de la pulpa de zarzamora. Universidad privada Antenor Orrego – Perú (Rodríguez, 2019)

Tanto en las técnicas tradicionales, por ejemplo, la extracción Soxhlet, como en las técnicas no tradicionales, en el caso del ultrasonido, se emplean disolventes los cuales son sustancias que permiten la dispersión de otras sustancias a nivel molecular o iónico para que se efectúe la transferencia de material desde la matriz hasta el disolvente. Los disolventes se pueden clasificar de acuerdo con su polaridad, su naturaleza química o su uso como sustancias puras o mezclas, de la siguiente manera:

3.8 Solventes

3.8.1 Solventes polares

Se trata de sustancias en la que la distribución de la nube electrónica se caracteriza por su asimetría y que contiene moléculas con polo tanto positivo como negativo, distanciados y que mantienen interacciones electroestáticas entre los dipolos. Estos a su vez se pueden subdividir en:

- ***Solventes próticos:*** que tienen un enlace tipo O-H o N-H, como el agua (H-O-H), el etanol ($\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{OH}$) y ácido acético [$\text{CH}_3 - \text{C}(=\text{O})\text{OH}$]
- ***Solventes apróticos:*** no tienen enlace tipo O-H o N-H, por lo que no dan ni reciben electrones, como la acetona $\text{CH}_3 - \text{C}(=\text{O}) - \text{CH}_3$ y el THF o tetrahidrofurano.

3.8.2 Solventes apolares

Por lo general, se trata de sustancias en las que la distribución de la nube electrónica no es asimétrica, sino simétrica. Esto trae como consecuencia la falta de polaridad; es por ello es que se habla de sustancias con dipolos permanentes. Compuestos como dietiléter ($\text{CH}_3\text{CH}_2 - \text{O} - \text{CH}_2\text{CH}_3$), tolueno ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$), cetonas o ciclohexano (C_6H_{12}) son algunos ejemplos tomados de la página web. <https://www.quimica.es/enciclopedia/Disolvente>.

3.8.3 Solventes orgánicos:

Se trata de aquellos compuestos orgánicos volátiles que son usados de manera individual o en una mezcla con otros compuestos.

3.8.4 Puros:

Se trata de los disolventes que se encuentran conformados por un único compuesto químico.

3.8.5 Simples:

Estos, en cambio, pueden contar con ciertas impurezas provenientes de otro compuesto que se encuentre en un disolvente no puro.

Para nuestro interés se ha valorado como solvente (DES) el Cloruro de Colina: urea; disolvente alternativo cuyas propiedades se definen a continuación:

3.9 Disolventes Profundos (DES)

A lo largo de los últimos años, se ha tomado conciencia sobre la toxicidad de los solventes utilizados en proceso industriales y los eventuales daños al ambiente que pueden ocasionar al desecharlos. En la búsqueda de solventes eficientes aparecieron como alternativos al uso de solventes orgánicos, los llamados líquidos iónicos; los cuales son mezclas de ciertas sales orgánicas que en determinadas concentraciones se convierten en líquidos aún a temperaturas bastante bajas; estos productos tienen numerosas aplicaciones industriales, pero en general no reúnen los requisitos necesarios para considerarlos “verdes” y son tóxicos. Además de ser en general sintéticos.(Choi et al. 2011)) y (Dai 2013)

Recientemente aparecieron nuevos solventes de este tipo conocidos como Disolventes Eutécticos Profundos (DES) cuyo término fue introducido por primera vez en el 2003 por (Abott) y hace referencia a una mezcla de dos o más componentes que forman un eutéctico caracterizado por un punto de fusión mucho menor que el de cada uno de sus elementos por separado (Casado Pascual 2016).

A partir de esto, algunos investigadores iniciaron sus exploraciones de la existencia de los DES en productos naturales particularmente en plantas o musgos etc., ya que muchos de sus componentes, azúcares simples, ácidos orgánicos tales como ácido málico, cítrico, aminoácidos u otros componentes se encontraban efectivamente combinando algunos de estos metabolitos en proporciones determinadas, y generaban líquidos viscosos que se denominaron Solventes Eutécticos Naturales NADES (Natural Deep Eutéctico Solvents), introducido por (Choi et al ,2001) y que hace referencia a aquellos eutécticos sintetizados a partir de sustancias tales como aminoácidos, azúcares, componentes celulares, ácidos orgánicos y derivados de colina principalmente (Casado Pascual, 2016).

En los últimos años el uso de disolventes eutécticos profundos naturales (NADES) como una alternativa ecológica a los solventes convencionales ha sido drásticamente estudiado. NADES representa una nueva generación de sales líquidas, generalmente basadas en mezclas de componentes relativamente baratos, no tóxicos y fácilmente disponibles como lo son las sales de amonio cuaternario, ejemplo el cloruro de colina con donantes derivados de puentes de hidrógeno no cargados como las vitaminas, aminas, azúcares, alcoholes, ácidos carboxílicos. que proporcionan un “perfil verde” y tiene buenas perspectivas para un uso más amplio en el campo de la tecnología. (Casado Pascual 2016).

Desde su aparición en el 2004 ha llamado la atención como solvente potencial en varios campos industriales, incluida la extracción de compuestos biológicamente activos en material vegetal. Algunos estudios han informado de las aplicaciones de los NADES para la extracción de compuestos fenólicos (Cicci, Sed, and Bravi 2017). Otras de las aplicaciones de este tipo de solventes es la industria farmacéutica, y de alimentos funcionales, ofreciendo la posibilidad de

combinar varias moléculas para solubilizar o extraer solutos con diferentes propiedades (polaridad, carga, etc.) (Cicci, Sed, and Bravi 2017).

Para la presente investigación se tomó como solvente eutéctico profundo natural el Cloruro de Colina: Urea, de fórmula molecular $C_5H_{14}ClNO$ (figura 15) siendo una sal orgánica ácida en forma de cristal higroscópico blanco que posee olor a pescado y su punto de fusión es de $240^{\circ}C$. Su solución acuosa al 10% tiene un pH de 5-6, sin embargo, es inestable en solución alcalina. Este producto es fácilmente soluble en agua y etanol, pero insoluble en éter de petróleo, benceno y disulfuro de carbono. Tiene baja toxicidad con LD 50 (3400 mg/Kg). (Bosiljkov and Dujmi 2016)

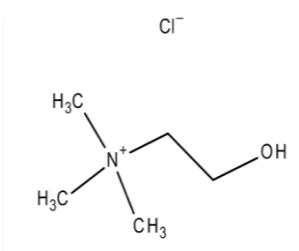


Figura 15. Fórmula estructural Cloruro de colina https://www.merckmillipore.com/CO/es/product/Choline-chloride,MDA_CHEM-500117?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.es%2F

El cloruro de colina, también conocido como relinga es una mezcla iónica a temperatura ambiente que se puede tratar con fácil preparación a partir de precursores baratos de origen natural y fácilmente disponibles, haciendo que sea biodegradable, bactericida, no tóxico; formando una estructura compleja impulsada por interacciones de enlaces de hidrógeno (Hammond, Bowron, and Edler 2016).

Muchas de las sales de amonio y las sales orgánicas de especies semejantes como el Cloruro de Colina:urea, están fácilmente disponibles como productos químicos a granel. De esta manera, el número de estudios que se centran en las aplicaciones de los DES están aumentando y

diversificando constantemente los campos de aplicación en los que se incluye catálisis, síntesis, preparación de nuevos materiales, separaciones, solubilización de fármacos y pretratamiento de la biomasa. (Juana and Roa 2012)

El Cloruro de Colina: urea en la proporción 1:2 presenta una temperatura de entre 12 °C. En la figura 16. Se representa la composición del Cloruro de Colina: urea como solvente DES; para lo cual constara de un n catión: n anión: m complejo organico en cual proporciona un nivel adicional de complejidad con un liquido ionico (IL) simple. (Juana and Roa 2012)

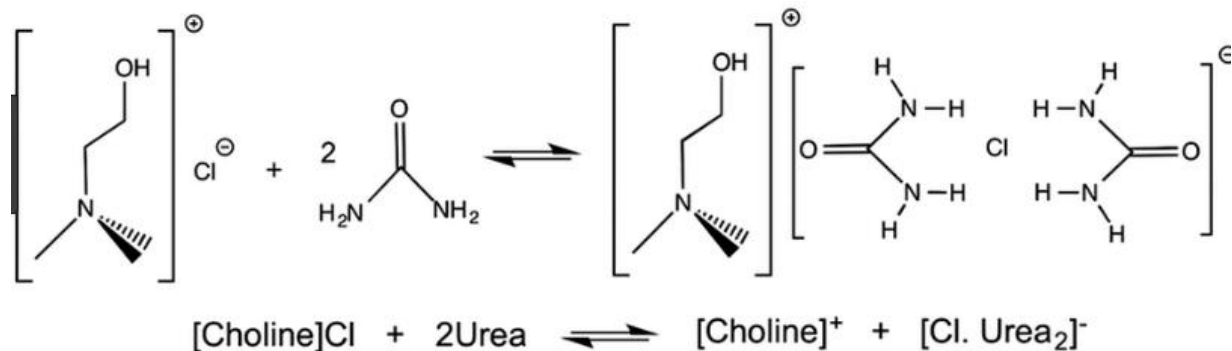


Figura 16. Reacción cloruro de colina: urea

https://ocw.unizar.es/ocw/pluginfile.php/911/mod_resource/content/1/Diapositivas%20m%C3%B3dulo%204.pdf

La rigidez conformacional de la urea en comparación de los otros complejos organicos comunmente empleados ejemplo glicoles; hace que la colina en su OH fucionalice con el ión, permitiendo que los enlaces de H de “amonio” interraccione con los enlaces de H “OH” más tradicionales. (Juana and Roa 2012)

4. JUSTIFICACIÓN

Uno de los principios más importantes en la Química Verde es el uso de solventes auxiliares más seguros con el ambiente. No hay duda de que los solventes juegan un papel esencial en los procesos químicos de transferencia de masa y calor. La selección del solvente apropiado juega un rol importante y decisivo en la extracción de un proceso (Monroy Vázquez, Totosaús, and García Martínez 2005).

El continuo desarrollo tecnológico que se está llevando a cabo, ha venido orientándose en la obtención de nuevas tecnologías y procesos ambientales responsables, bajo el objetivo de reducir la emisión de sustancias contaminantes al ambiente y mejorando la calidad de vida de las personas. Algunas herramientas utilizables en este medio son la incorporación de materias primas inocuas y renovables en procesos naturales, utilizando condiciones de reacción alternas, como el empleo de solventes con baja toxicidad para la salud y el ambiente, y la utilización de catalizadores que puedan ser fácilmente recuperados y reutilizados; de este modo, incrementando la selectividad de las reacciones y disminuyendo los residuos y las emisiones contaminantes. (Pajaro and Tadeo 2011)

Actualmente la industria química, produce grandes volúmenes de desechos y subproductos en los procesos de extracción. En los últimos años, el uso de Solventes Eutécticos Naturales Profundos (NADES) ha representado una nueva clase de solventes, fabricados con productos naturales ampliamente disponibles, no tóxicos y biodegradables, generando una herramienta para dar curso a nuevas investigaciones y mitigar aquellos problemas ambientales causados por los solventes convencionales.

Aunque los solventes Eutécticos Naturales (NADES) han despertado interés, la información acerca de este tipo de solventes en los análisis de procesos de extracción aun es mínima, dejando espacios a la investigación de sus propiedades e interacciones.

El presente estudio tuvo como finalidad, evaluar la eficacia del Solvente Eutéctico Natural Profundo el cual está constituido por una sal de haluro (cloruro de colina) y un donador de hidrógeno (urea), mezcla que de acuerdo al ámbito académico cuenta con características de bajo punto de fusión, biodegradable, biocompatible y biorenovable, en una técnica de la extracción asistida por ultrasonido, que busca la reducción del consumo de energía, tiempo de extracción y aumento de rendimiento.

Para ello se tomó como analito a identificar, el 3-cianidinaa -glucósido de la Antocianinas presentes en el fruto de la Mora de Castilla (*Rubus Glaucus Benth*) fuente rica de polifenoles mayoritariamente en taninos elágicos y antocianinas.

A partir de este análisis se buscó establecer como las variables de tiempo en ultrasonido, temperatura, tipo de solvente pueden determinar la eficiencia de la extracción a su vez como esta mejora en relación a los gastos comparados de una extracción realizada mediante métodos tradicionales.

Esto evaluado desde la parte cuantitativa y cualitativa mediante los análisis de determinación de contenido de fenoles, la actividad antioxidante por medio de las técnicas de ABTS y DPPH, y la identificación de antocianinas mediante las técnicas instrumentales de espectroscopia UV-VIS y cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC. El desarrollo de este proceso busca como resultados que el solvente Cloruro de Colina: urea sea visto como un solvente efectivo de superior

o igual, al uso de solventes tradicionales al igual que la Extracción por Ultrasonido sea el medio por el cual se reduce en tiempos y costos la extracción desde un sustrato vegetal.

De acuerdo con el contexto presentado, el presente trabajo investigativo propone como objetivos general y específicos los siguientes:

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar la eficiencia de la técnica de extracción asistida por ultrasonido utilizando como Solvente Eutéctico Natural Profundo (NADES) el Cloruro de Colina: urea bajo orientación de una técnica tradicional de extracción utilizando como solvente común el metanol, para la obtención de extractos con actividad antioxidante a partir del fruto de la Mora de Castilla (*Rubus Glaucus Benth*).

5.2 Objetivo Específicos

- I. Establecer cómo afecta el tiempo de maceración en ultrasonido, la temperatura y naturaleza del solvente sobre el rendimiento de extracción, en el proceso empleando Cloruro de Colina: Urea asistido por ultrasonido partir del fruto de la Mora de Castilla (*Rubus Glaucus Benth*), teniendo como guía un solvente tradicional como metanol.
- II. Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos a partir del fruto de la Mora de Castilla (*Rubus Glaucus Benth*), empleando como solvente Cloruro de Colina: urea mediante el uso de la técnica de extracción asistida por ultrasonido.
- III. Sugerir una metodología analítica para la identificación del analito cianidina-3- glucósido compuestos fenólicos de la Antocianina de los extractos obtenidos por el método de Extracción por Ultrasonido bajo el solvente Cloruro de Colina: urea, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

- IV. Identificar mejoras del proceso de extracción de antocianinas en los métodos determinados de Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU) en comparación con la extracción convencional Soxhlet.
- V. Calificar si el solvente Cloruro de Colina: urea se puede determinar cómo solvente aplicable en la Química Verde.

6. METODOLOGÍA

El estudio se dividió en seis (06) etapas: (1) Preparación del material vegetal. (2) Obtención de extracto mediante el método tradicional Soxhlet y alternativo Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU), para lo cual se planifico un diseño experimental (variables) en la cual a su vez se determina los rendimientos. (3) Evaluación del Contenido Total de Fenoles (CTF) por medio de técnica Folin Ciocalteu. (4) Evaluación del Contenido Total de Antocianinas (CTA). (5) Evaluación de la actividad antioxidante por medio de las técnicas ABTS y DPPH. (6). Identificación del analito 3-cianidinaa glucósido mediante la técnica instrumental de Cromatografía líquida de Alta Eficacia (HPLC). El diagrama de la metodología se resume en la figura 17.

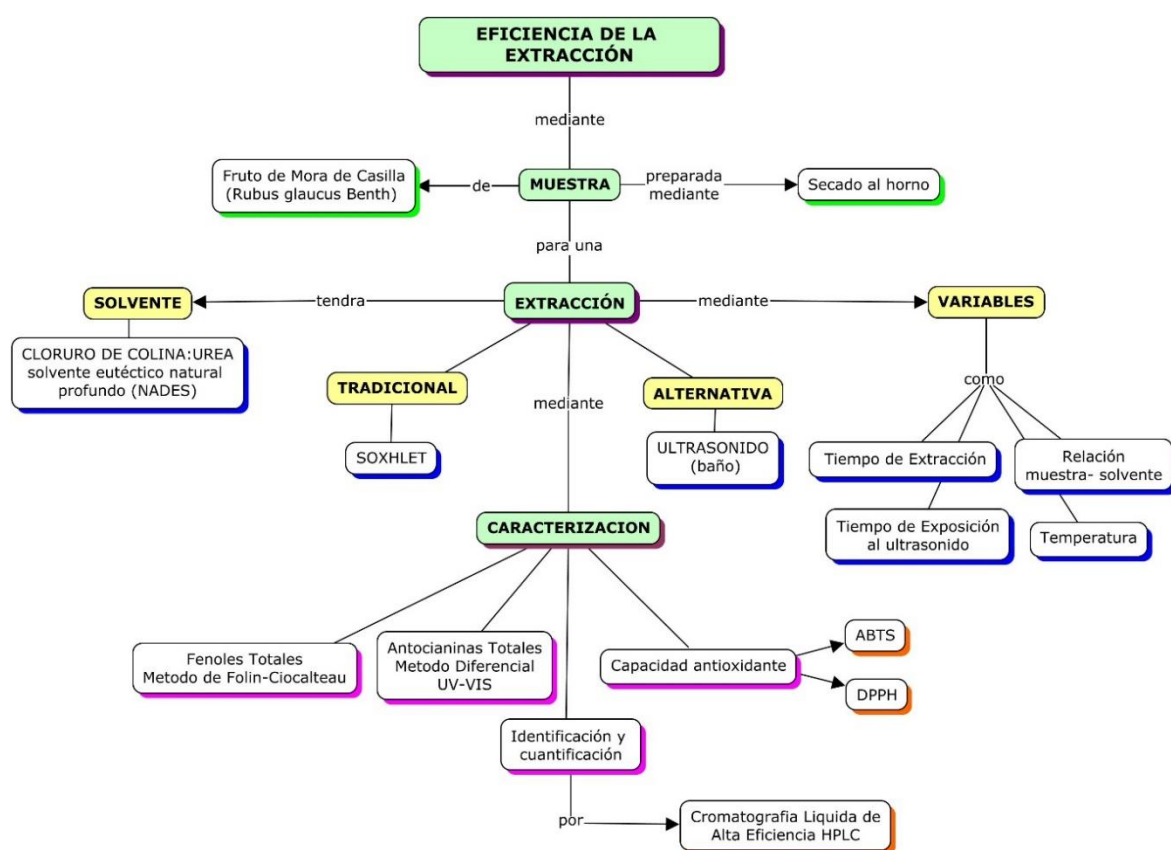


Figura 17. Diagrama del procedimiento de extracción. Fuente PROPIA

6.1. DESARROLLO DE LA METODOLOGIA

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, se describe cada una de una de las seis (06) etapas, al igual los reactivos, solventes y preparación de muestras utilizados en todo el proyecto investigativo así:

6.1.1 Reactivos y solventes

Reactivos:

Folin-Ciocalteu al 99,0%: Reactivo fenol, Marca PANREAC, densidad 1,234 kg/l, liquido. Código de producto 251567; composición: Sodio Tungstato 2- hidrato: 10g; Sodio Molibdato 2-hidrato: 2,5 g; Acido orto-fosfórico 85%: 5ml; Ácido Clorhídrico 35%: 10 ml; Litio sulfato 1- hidrato: 15 g; Agua (c.s.p): 100 ml.

Sulfato Férrico en Solución al 99,0%: $Fe(SO_4)^3$; UN 3264; Marca PANREAC.

Potasio Persulfato al 99,0 %: Riqueza mínima (Yodo): 99,0%; masa molar 270,33 g/mol; código 121525; solido; nombre del producto Potasio Peroxodisulfato (Reag. PhD. Eur.) para análisis; límite máximo de impurezas: Insoluble en H_2O : 0,01%; compuestos de Cl (en Cl): 0,005%; metales pesados (en Pb): 0.001%; Cu: 0,001%, Fe: 0,0005%; Mn: 0,0002%; Ni: 0,001%, Pb: 0,001%.

Sodio carbonato: Marca CHEMI, reactivos analíticos, 100 g. PM: 105,99 g/mol; contenido 99,78%; material insoluble: 0,025%, cloruro: 0,01%, fosfato: 0,005%, sulfato: 0,025%; metales pesados (en Pb): 0,001%. 500 g.

Alcohol etílico Absoluto C_2H_5OH marca Chemi P.M 46.07 g/mol, concentración 99.9%

Urea: CH_4N_2O Grado de Biología Molecular +20°C, Marca Calbiochem absorbancia: ≤ 0.01 a 260 nm y 280 nm.

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (free radical, 95% : $C_{18}H_{12}N_5O_6$; lot X13C042. 1g. Marca ALFA AESAR.

2,2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, 98%: LOT. U05C006. 1g. Marca ALFA AESAR.

(\pm)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chromane-2-carboxylic acid al 97%. Marca SIGMA-ALDRICH; PM: 250.29 g/mol; mp 187-189°C (Lit).

Solventes

0,001 % HCl en Metanol Grado analítico al 99,0% ; masa molecular 32,04 g/mol; grado ACS, ISO, Reag. Ph Eur. Marca EMD Millipore offers EMPART

Etanol grado analítico al 99,5% Marca Chemí, masa molar 46,07 g/mol, densidad 0.790 - 0.793 g/cm³ (20 °C).

Cloruro de colina: Marca SIGMA ≥ 98 %: el cloruro de colina es la forma sintética de vitamina B4, colina y en un alimento común para aves. PM: 139.62 g/mol; mp 302-305°C (dec)(lit.). higroscópico, almacenar como gas inerte.

Preparación de mezclas

Preparación de la mezcla eutéctica (Cloruro de Colina-urea): En un matraz de 100 ml a temperatura ambiente se tomó 350 mmol (50g) de cloruro de colina (CHCl) sólido y 910 mmol (55.9 g) de Urea solido; la mezcla se calentó a 80°C durante 1 hora, obteniendo la mezcla eutéctica.

6.1.2 Preparación del material vegetal

El fruto fresco fue adquirido en un mercado local de la ciudad de Bogotá Calle 24 a Sur No 76, área urbana, departamento de Cundinamarca cuyas características geográficas fueron: Altitud 4°35'56"N 74°04'51"O; temperatura 14.5°C , humedad relativa 71% y presión de 1.017 hPa . La selección de los frutos se realizó de acuerdo con la Carta de colores de la NTC 4106 tomando como referencia los estados E3 y E4 de acuerdo a metodología expuesta por (Sanchez Leon 2012). Los receptáculos fueron removidos de las drupas de forma manual y estas fueron lavadas con agua destilada tipo I. Posteriormente, el fruto (drupas) fue secado en un horno a 50 °C durante 48 h. El material seco fue triturado de manera manual hasta obtener un polvo fino, el cual fue almacenado bajo refrigeración hasta su uso.

6.1.3. Obtención de extractos

6.1.3.1 Método Soxhlet

Para la extracción Soxhlet se emplearon 100 g de fruto seco y pulverizado, los cuales fueron puestos en maceración estática en contacto con el solvente dispuestos en 0,001 HCl en Metanol al 99.8 % de concentración, teniendo como variable de control el tiempo, definido para este proceso 1080 minutos en un dedal elaborado con papel filtro y un Soxhlet de 250 mL, el cual fue mantenido a reflujo a 65 °C durante 8 h , con el fin de dar control a la temperatura se tomó registro en los reflujos del proceso hasta completar las 8 horas. La extracción fue realizada por triplicado. El

presente proceso se tendrá como pauta para determinar la efectividad de la extracción bajo el método alternativo , toda vez que de acuerdo a la tesis “*Determinación de Antocianinas, fenoles totales y Actividad Antioxidante en licores y fruto de mora de* (Leyva Daniel 2009) este tipo de análisis obtuvo los mejores resultados de extracción con un solvente tradicional.

6.1.3.2 Extracción asistida por ultrasonido (EAU)

Para EAU se emplearon 2 g de fruto seco y pulverizado, los cuales fueron colocados en balón de fondo plano de 25 mL junto con 10 mL de la mezcla eutéctica preparada. La extracción se llevó a cabo en dos etapas: maceración estática: consistente en colocar el fruto preparado en contacto con el solvente eutéctico Cloruro de colina: urea, para este proceso se tuvo en cuenta dos variables: 1. Tiempo de maceración determinada en los rangos (60 min-80 min-120 min) y temperatura, la cual se manejó en los rangos de (30°C-40°C-50°C) y maceración asistida por ultrasonido consistente en colocar en contacto de una onda ultrasonido mediante baño, cuya variable a evaluar fue de tiempo determinada en los rangos (20 min-40 min-60 min). Con el objetivo de que estas variables fuesen controladas, el baño ultrasonido de marca Brand cuenta de manera automática con control de temperatura y tiempo de cavitaciones definidas digitalmente. En todos los casos la potencia del baño fue constante en 150 KHz. Los procesos de extracción fueron realizados por triplicado.

6.1.3.3 Diseño experimental

De acuerdo a la metodología determinada las variables a tener en cuenta para evaluar la efectividad del solvente eutéctico Cloruro de colina: Urea fueron: tiempo en maceración Estática (60 min-80 min-120 min), temperatura (30°C-40°C-50°C) y tiempo en maceración en ultrasonido

definido en los rangos de (20 min-40 min-60 min). Estas dos variables se estudiaron de manera preliminar, mediante un diseño experimental exploratorio con puntos arbitrarios; sobre el rendimiento de extracción, el Contenido Total de Fenoles (CTF), el Contenido Total de Antocianinas (CTA) y la actividad antioxidante se valoraron en comparación con los resultados obtenidos en el método guía en Solthex y solvente al 0,001 HCl en Metanol al 99.8 % de concentración.

Los puntos del diseño experimental exploratorio evaluados en el solvente de interés de esta investigación (Cloruro de Colina: urea) se resumen a continuación en la tabla 7. Diseño experimental exploratorio para el proceso de Extracción Asistida por Ultrasonido así:

Tabla 7. Diseño experimental exploratorio para el proceso EAU.

Maceración estática		Maceración asistida por ultrasonidos
Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
60	30	20
80	40	40
120	50	60

6.1.3.4 Determinación de rendimientos

Los extractos Soxhlet y EUA fueron secados a presión reducida en un evaporador rotatorio y el rendimiento de extracción (%Y) se determinó de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\%Y = \frac{w_2(g)}{w_1(g)} \times 100 \quad \text{Ec. 1}$$

Donde w_2 corresponde a la masa del extracto seco y w_1 a la masa de fruto seco y pulverizado empleado para cada proceso de extracción. Luego de determinar el rendimiento los

extractos fueron reconstituidos en Etanol grado analítico a 98 mg/mL y almacenados bajo refrigeración hasta su posterior uso.

6.1.4 Evaluación del Contenido Total de Fenoles (CTF)

CTF se determinó siguiendo el protocolo de (Osorio 2017) para ello, se tomaron 20 μ L de extracto etanólico reconstituido, 1580 μ L de agua y 100 μ L de reactivo de Folin y fueron mezclados. La mezcla de reacción se agitó en Vortex por 5 s y posteriormente se adicionaron 750 μ L de solución acuosa de carbonato de sodio 0.2 mg/ml. La reacción se desarrolló en la oscuridad por 2 h. Luego se registró la absorbancia de la mezcla a 765 nm usando un equipo (Varian Cary 100). Como estándar se empleó ácido gálico con el cual se realizó una curva de calibración con concentraciones entre 0,05 a 0,5 mg/Ml. El CTF se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico mg EAG/ 100 g de muestra secas.

6.1.5. Evaluación del contenido total de antocianinas (CTA)

Para el análisis del contenido de antocianinas se desarrolló el siguiente procedimiento descrito por (Leyva Daniel 2009). Se preparó una solución buffer de KCl al 0,025 M ajustado el pH hasta 1.0 y una solución buffer de acetato de sodio 0.4 M ajustado el pH 4.5. Se tomó una alícuota de extracto diluyendo con buffer de pH 1.0, midiendo la absorbancia a 515 nm, luego de hallar la disolución adecuada que se encontrara en el rango lineal, se procedió a preparar diluciones de las muestras con los dos buffers conservando el factor de dilución hallado. Después de realizado este procedimiento, se agitaron las muestras y se realizaron las lecturas con cada buffer a 515 nm, se leyeron dentro de los 60 minutos siguientes a la preparación. Por último, se calculó la concentración del PAM teniendo en cuenta el peso molecular de la cianidinaa-3-glucosido de

449.2 g L^{-1} , por ser el pigmento predominante en este tipo de frutos.

6.1.6 Evaluación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó mediante los métodos radicalarios de DPPH y ABTS, como se describe a continuación:

6.1.6.1 DPPH

De acuerdo al procedimiento establecido por (Ospina 2017) para el método DPPH, se preparó solución stock de DPPH al 24% p/v en Metanol porcionando con volúmenes de 10 mL y almacenando a 20°C hasta su uso. Se tomó 10 mL de la solución stock mezclar con 45 mL de Metanol para una absorbancia de $1,100 \pm 0,02$ a 515 nm. Tomando 950 μ L de la solución stock de DPPH y midiendo la absorbancia inicial a 515 nm. Luego se adicionan 50 μ L de extracto etanólico y se agitan en Vortex por 5 segundos tapando cada muestra. Finalmente se tomaron medidas de absorbancia a 515 nm cada 10 minutos durante 2 horas hasta llegar a lectura constante. Se realizó curva de calibración en Trolox entre 25 μ M y 500 μ M.

6.1.6.2. ABTS

En el método ABTS, se preparó en primera medida la solución stock ABTS tomando 7,0 mM de persulfato de potasio en 2.5 mM en agua, se agitó a 4°C durante 16 horas en la oscuridad, diluyendo la solución stock con Etanol hasta obtener la solución de trabajo con absorbancia a 734 nm de $0,700 \pm 0,03$. Se tomó 1000 μ L de la solución de trabajo, incubándola a 30°C durante 5 minutos midiendo la absorbancia inicial. Se adicionaron 10 μ L del extracto y fueron incubados a 30°C. Finalmente se tomaron medidas de absorbancia a 734 nm cada 10 minutos durante 1 hora

hasta llegar a una lectura constante de absorbancia final. Para los cálculos necesarios se realizaron curvas de calibración con Trolox entre 300 μ M a 1500 μ M de acuerdo al procedimiento (Monica 2017).

6.1.7. Identificación analito de interés 3-cianidina-glucosido

6.1.7.1. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia HPLC

El análisis de antocianinas se realizó en un equipo instrumental de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) marca THERMO ubicado en el laboratorio de Química Forense de la Dirección de Investigación Criminal e INTERPOL con un detector de matriz de diodos, y con la longitud de onda establecida en 520 nm. La separación de las antocianinas se realizó en una columna C18, a un caudal de 0,2 ml min⁻¹. Las fases móviles fueron: (A) ácido fórmico acuoso al 1% (v / v); y (B) Metanol. Se utilizó el siguiente gradiente de elución, de acuerdo con el solvente. B: 0-20 min, 14% –23%; 20–40 min, 23% –35%; 40–50 min, 40%; 50–60 min, 60%; 60–65 min 95%. La temperatura de la columna se mantuvo a 30°C y el inyector automático a 4 °C. Este análisis se realizó y valoro de acuerdo a validación del método de análisis de sustancias orgánicas en sustancias de estupefacientes determinado por el Laboratorio de la Dirección de Investigación Criminal e INTERPOL de la Policía Nacional, por lo que solo se identifica el analito con patrón estándar y no se cuantifica, velando por los procesos aprobados y acreditados por el Organismo de acreditación a Laboratorios ONAC.

El presente ensayo solo fue valorado para los extractos obtenidos en el solvente evaluados de Cloruro de Colina: urea.

7. RESULTADOS

La utilización de tecnologías verdes y sostenibles, basadas en los principios de la Química verde buscan descubrir, desarrollar y diseñar procesos de extracción con un consumo óptimo de materias primas de disolventes y energía. Los Disolventes Naturales Eutécticos Profundos (NADES) han sido una alternativa verde a los solventes convencionales empleados como lo son: acetona, metanol y etanol para la extracción de polifenoles en muestras vegetales. Un principio de extracción en la química verde es el uso de tecnologías innovadoras para la reducción de energía para lo cual, esta investigación tuvo de conveniencia utilizar la extracción por ultrasonido (EAU) reconocida por proporcionar una excelente fuente de energía y así promover la reducción de tiempos y mejora en la calidad de los extractos. (Bosiljkov and Dujmi 2016)

En esta investigación, se estudió la extracción por ultrasonido utilizando un solvente no convencional, como lo es el Cloruro de colina: urea y baño ultrasonido. Éstos dos acoples no convencionales fueron utilizados para recuperar, la antocianina cianidina 3-glucósido, medio por el cual se determinaría la efectividad de la extracción bajo este modelo determinado.

Basado en los datos preliminares y en la recopilación de la literatura sobre el Cloruro de Colina: Urea como disolvente Natural Eutéctico Profundos (NADES), la presente investigación tuvo en cuenta el tiempo de extracción y temperatura como variables, y se buscó establecer unas variables ideales en la extracción de antocianinas quienes cuentan con las características de ser muy inestables y susceptibles a la termo degradación; de esta manera se puede obtener un mayor contenido de fenoles y actividad antioxidante. Los resultados del estudio y las variables utilizadas se resumen en la tabla 8.

Tabla 8. Resumen resultados de Laboratorio

Ensayo	Tiempo ^{ME} (min)	Temperatura ^{ME} (°C)	Tiempo ^{MAU} (min)	% Y	CTF	CTA	EC ₅₀	TEAC
1	60	30	20	44 %±3,8	0,012±0,02	0,0489±0,22	0,325±0,04	0,564±0,04
2	80	40	40	44,5%±3,8	0,014±0,04	0,0184±0,03	0,325±0,03	0,573±0,04
3	120	50	60	43%±3,7	0,021±0,04	0,0562±0,02	0,318±0,07	0,575±0,06
Soxhlet	1080	-	-	20%±2,5	0,043 ± 0,1	0,003±0,003	0,323±0,04	0,570±0,07

^{ME} Maceración estática; ^{MAU} Maceración asistida por ultrasonido; CTF: Contenido total de fenoles (mg EAG/ 100 g BS); CTF (mg EAG/g); CTA (unidades), EC₅₀: (concentración efectiva 50 en mg/mL del extracto que inhibe al DPPH) y TEAC: equivalentes Trolox (mM). Los valores corresponden al promedio (n = 3) ± la desviación estándar.

En la misma se observa los resultados obtenidos para el solvente de análisis Cloruro de Colina: urea en las variables de: tiempo de maceración Estática, temperatura, tiempo de maceración asistida por ultrasonido; al igual que la evaluación de rendimiento (%Y), Contenido Total de Fenoles (CTF), Contenido Total de Antocianinas (CTA) y Capacidad Antioxidante (ABTS y DPPH); lo cual nos deja determinar el comportamiento del analito de interés (antocianina-3-cianidina glucosido) bajo las variables establecidas. Los resultados obtenidos del método Soxhlet se utilizaron como medio de comparación de un ideal académico, aclarando que no se valoró las variables de temperatura, ni maceración asistida por ultrasonido siendo variables de evaluación solamente para el método de extracción EAU con el objetivo de determinar unas variables ideales o de mejora para un proceso ya estandarizado.

Por lo tanto se analizaron los siguientes resultados en la valoración de efectividad del cloruro de colina:urea como solvente en extracción asistida por ultrasonido así:

Los porcentajes de rendimientos de Cloruro de Colina:urea en las variables de tiempo (60 min-80 min-120 min) y temperaturas de (20°C-40°C-60°C) se encontraron entre los rangos del 43% a 44,5% con un promedio de 43,8% con diferencias de 0,5 y 1 entre las primera y última

variable, generando un mejor rendimiento el ensayo 2 a una temperatura de 40°C y 40 minutos en Maceración asistida por ultrasonido; evidenciando que no hay diferencias significativas en los rendimientos.

Para los resultados bajo soxhlet que ha sido guía para el análisis, no es posible generar una comparación efectiva ya que aunque se realizó por triplicado no hubo cambios en tipo de solvente, temperatura o tiempo en ultrasonido el mismo se valoró como medio académico para determinar si el porcentaje de la extracción de Cloruro de Colina:urea era distante al porcentaje hallado en un proceso de extracción tradicional de laboratorio con un solvente que ya ha sido valorado con anterioridad y del cual se afirmó por parte de (Leyva Daniel 2009) el de mejor resultado en la extracción de polienoles en un extracto vegetal. Para la investigación el porcentaje se dio sobre el 20% $\pm 2,5$ en un solo análisis por triplicado, en cambio para el Cloruro de Colina en tres variables bajo un total 27 análisis se dio un promedio de 43,8% , incomparable de acuerdo a lo aspecto anteriormente expuesto, aclarado que el análisis de solvente no convencional si cumplió con un mínimo de resultado y no fue inferior al obtenido con el solvente Metanol.

Esta diferencia no significativa del rendimiento en las variables definidas fueron confirmadas con la realización de las pruebas t student bajo el programa Excel 2016 que tiene como objetivo determinar las diferencias entre las medidas de dos grupos, cuyos resultados se exponen en la tabla 9. Resultados para la prueba T student así:

Tabla 9. Resultados para la prueba T student.

Solventes	Resultados Prueba T Student (diferencia)
Entre solvente A y Solvente B1 (metanol vs Cloruro de colina.Urea a 30°C)	0,1831
Entre solvente A y Solvente B2 (metanol vs Cloruro de colina.Urea a 40°C)	0,1914

Entre solvente A y Solvente B3 (metanol vs Cloruro de colina.Urea a 50°C)	0,2009
--	--------

Con el análisis de corroborar lo ya determinado en los resultados de laboratorio en donde el porcentaje de rendimiento (%Y) sobre las variables definidas no fueron significativas es de esta manera que para las variables sobre la temperatura de 30°C, de dio sobre 0,1831; para la temperatura de 40°C fue de 0,1914 y para la temperatura de 50°C estuvo con 0,2009 existiendo un promedio de resultados de 0,1918 y una diferencia de 0,091 entre las variables solvente B1 y B2; entre B2 y B3 de 0,009 y entre B1 y B3 de 0,017.

Otro medio para conocer la variabilidad de los resultados en relación al porcentaje de rendimiento (%Y) del solvente Cloruro de colina:urea en extracción por ultrasonido fue el uso de la ANOVA del paquete estadístico SPSS cuyo análisis de varianza prueba la hipótesis de que las medidas de dos o más poblaciones son iguales, sin diferencias significativas como se resume en la tabla 10. Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra.

Tabla 10. Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	908,407	2	454,203	3,247	0,069	3,738
Columnas	21543,916	7	3077,702	22,003	1,561E-06	2,764
Error	1958,260	14	139,875			
Total	24410,5846	23				

El resultado de la ANOVA sería el siguiente: “F (2,7)=22,003, p<1,56”

De la cual el programa estadístico determina como resultados de la ANOVA “F (2,7)=22,003, p<1,56”; siendo relevante para nuestro estudio que p fue menor al valor crítico con

resultado de 1,56 concluyendo que la hipótesis es nula por lo tanto las medidas son iguales y no se tiene una diferencia significativa.

Los otros aspectos a valorar en el análisis de resultados de laboratorios fueron:

Capacidad Total de Fenoles (CTF)

El análisis del Contenido Total de Fenoles del Cloruro de colina.urea bajo las variables de maceración estática determinada en tres temperaturas 30°C, 40°C y 50°C y maceración en ultrasonido en tiempos de 20 min, 40 min, y 60 min, técnicas de extracción de polifenoles; se observó que los resultados generados fueron: de 0,012; 0,014 y 0,021 respectivamente, siendo las diferencias no significativas y dadas entre el rango de 0,002 y 0,007 en donde podemos diferir que la sonificación permitió observar unos resultados crecientes en el aumento de tiempo de exposición al igual que en un aumento de temperatura. Esto soportado en (C.N Quiroz-Reyes, M.A. Aguilar –Méndez 2013) en donde su estudio de comparación de las técnicas de ultrasonido y maceración para la extracción de polifenoles en cacao afirma que los efectos mecánicos de sonificación permiten una mayor penetración del disolvente en las células, mejorando la transferencia de masa, en el proceso de excitación, la onda de ultrasonido también puede romper de manera eficiente el tamaño de la partícula del material vegetal, facilitando cuando la partícula es más pequeña la liberación de polifenoles.

Otra variable a valorar y tomar en cuenta en este estudio es el estado de maduración que de acuerdo al estudio de (Bernal, Melo, and Díaz Moreno 2014) en el proceso de Contenido Total de Fenoles, de lectura a 765 nm y cuantificación en referencia a una curva de ácido cafeico de ácido cafeico ($R^2=0,995$) los datos se reportan como mg de ácido cafeico g⁻¹ fruta fresca,

determinado que en el estado de madurez verde fue de $CT = 3,33 \pm 7,30$, en el estado intermedio $CT = 2,92 \pm 2,79$ y maduro $CT = 2,68 \pm 2,48$, permitido determinar qué estado de madurez de la fruta es una variable determinante en este tipo de valoración, esta última variable tomada en cuenta en nuestro proceso al utilizar los tipos SINEP E3 y E4.

En relación al análisis realizado con el solvente Metanol este solo tuvo como variable determinada la maceración estática dada en el 1.080 minutos y teniendo resultado de CTF en 0,043, el mismo no puede ser valorado o comparado ya que no se puso en maceración de ultrasonido o se le realizó algún cambio de temperatura, siendo este análisis mayor al de cloruro de colina pero no superior a bibliografía encontrada sobre el mismo tipo de solvente. Nos deja deducir que la metodología es aplicable en los dos tipos de solventes determinados y se contará con unos resultados analíticos aceptables.

Contenido Total de Antocianinas CTA

La cantidad de antocianinas se determinó por el método pH diferencial, el cual es un método espectrofotométrico que se basa en la transformación estructural de las antocianinas con el cambio de pH (pH 1 coloreadas y pH 4.5 incoloras) para tal se hizo la curva de calibración en el espectrofotómetro, con el fin de generar la ecuación de la regresión lineal y poder aplicar los modelos matemáticos de pH diferencial y determinar la concentración

Procedimiento realizado mediante los cálculos de la concentración de la Evaluación de Pigmentos Antocianos Monoméricos (PAM) observados en la (Tabla 11) teniendo en cuenta el peso molecular del cianidina-3-glucosido, por ser el pigmento predominante en estos frutos (Sanchez Leon 2012) en donde como unidad de muestra se tomó 1 mg de muestra en los tiempos de 5, 10 y 15 min obteniendo los siguientes resultados, resumidos en las tablas 11 y 12 y figuras

18 y 19

Tabla 11. Promedio de absorbancia en pH 1 y pH 4.5 en los tiempos establecidos

PH 1				
tiempos	Soxhlet	Cloruro de colina: urea 30°C	Cloruro de colina: urea 40°C	Cloruro de colina: urea 50°C
5	0.324	0.324	0.327	0.329
10	0.322	0.325	0.328	0.329
15	0.320	0.325	0.328	0.329
PH 4.5				
5	0.322	0.3205	0.3213	0.3102
10	0.3218	0.3207	0.3215	0.3104
15	0.3214	0.321	0.3217	0.3107

Tabla 12. Promedio de los pigmentos Antocianos Monoméricos (PAM) en los tiempos establecidos

PAM				
TIEMPO	Soxhlet	Cloruro de colina: urea 30°C	Cloruro de colina: urea 40°C	Cloruro de colina: urea 50°C
5	0.005	0.012	0.018	0.056
10	0.002	0.013	0.019	0.057
15	-0.003	0.012	0.019	0.056

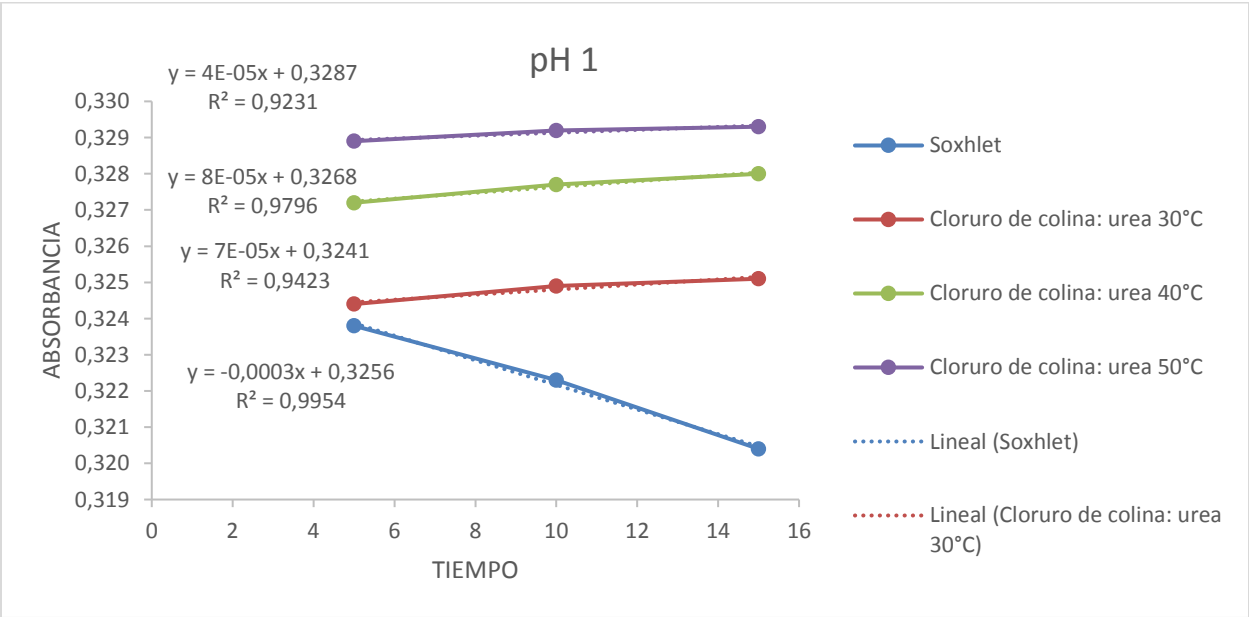


Figura 18. Absorbancia vs Tiempo a un pH 1

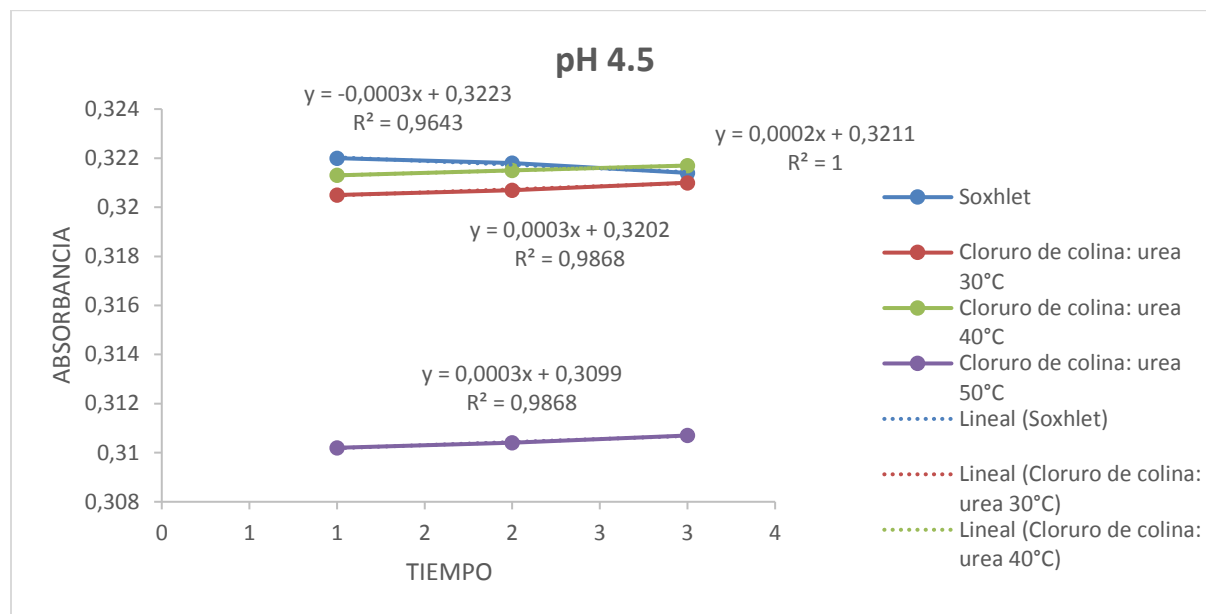


Figura 19. Absorbancia vs Tiempo a un pH 4.5

De los siguientes resultados se logra evidenciar que, a un pH de 1, para el primer método en Soxhlet se obtuvo un $R^2=0,99$ y un PAM entre (-0,003 a 0,005) muy cercano los resultados al segundo método en donde las temperaturas de 30°C, 40°C y 50°C, tuvieron $R^2= 0,94; 0,97$ y $0,92$ y PAM de (0.012-0,057).

Para el pH de 4,5 en el primer método en Soxhlet se obtuvo un $R^2=0,96$ donde para el solvente NADES, los resultados fueron mejores con las temperaturas de 30°C, 40°C y 50°C, tuvieron $R^2= 0,98; 1$ y $0,96$. Siendo de esta manera satisfactorio los resultados del solvente Cloruro de Colina: urea.

Este tipo de resultados ayudó a predecir que los comportamientos generados en la producción de antocianinas son similares a los de la literatura, aunque cabe recalcar, que la dispersión de estos depende del tipo de metodología de extracción, las condiciones edáficas y ambientales del fruto. Por ejemplo un estudio realizado con *Acai* por Rojano,2005 encontró

concentraciones de antocianinas de 268,5 mg /100g muestra en el 2011, luego otro investigador toma como referencia la misma industria colombiana, para realizar el reporte del contenido de antocianinas presente en dicho fruto, con un valor de 4,58 mg/100g de muestra, llegando a la conclusión que es necesario recurrir a estudios físico químicos de mayor profundidad, para comparar la variación de resultados, siendo un mismo sitio y fruto de análisis. (Díaz Kelly, 2019)

Actividad antioxidante

En relación a la **actividad antioxidante** bajo los métodos de ABTS y DPPH del Cloruro de Colina:Urea tuvo el presente comportamiento obteniendo los siguientes resultados así:

Método DPPH

Bajo la metodología escritas por (Osorio 2017) en el estudio de la capacidad antioxidante de los extractos para inhibir la formación del radical libre de DPPH e interpolados los valores obtenidos en el laboratorio de la capacidad antioxidante del Cloruro de colina:urea cuyo resultado fueron de: (30°C) = $0,325 \pm 0,04$; (40°C) = $0,325 \pm 0,03$; (50°C) = $0,318 \pm 0,07$ en la curva de calibración con Trolox de 25 μM a 500 μM y de ecuación $0,0051x + 0,5608$, en la cual como coeficiente de determinación fue R^2 : 0,9595, observables en la figura 20. Curva patrón Trolox y resultados de lectura de las muestras en los dos métodos, esto determinando un comportamiento ajustado a la metodología establecida, asimismo que las diferencias que se estuvieron para el Cloruro de Colina: urea fue entre 0 y 0,007 diferencias no significativas; de igual manera el valor obtenido de la capacidad antioxidante en solvente Metanol fue de $0,323 \pm 0,04$ existiendo una diferencia promedio de los dos métodos de tal solo un 0,001. Por lo que podríamos diferir que la cuantificación de actividad antioxidante no se encuentra sesgada al tipo de solvente con que se realice la extracción al sustrato vegetal; en relación a la variable de tiempo en solvente,

temperatura y tiempo en ultrasonido no se logró determinar alguna influencia de las variables en los resultados de capacidad antioxidante en DPPH, esto a que sobre los dos métodos no se realizó la misma metodología en relación a las variables diseñadas.

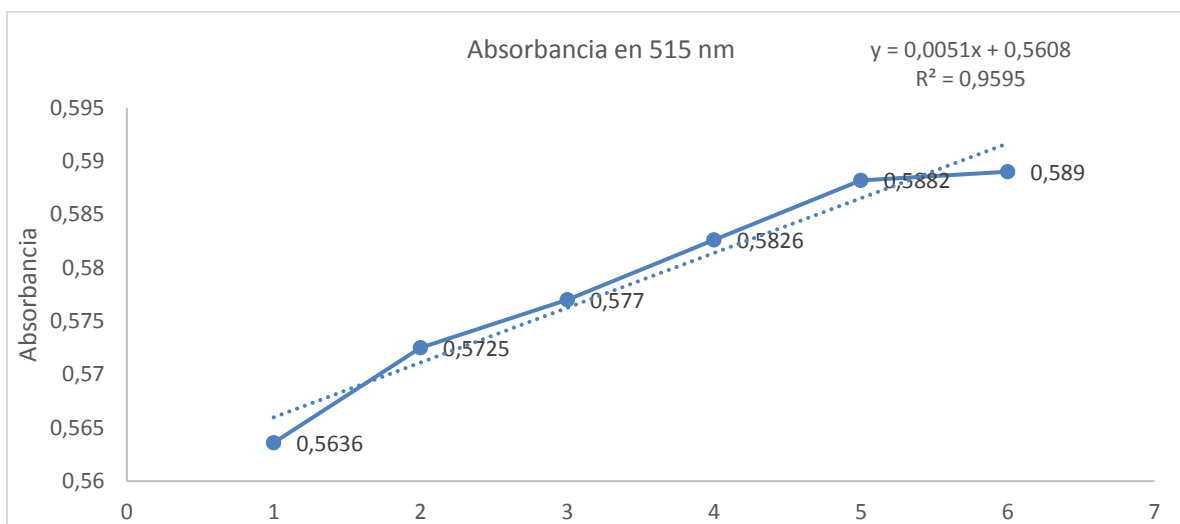


Figura 20. Curva patrón Trolox y resultados de lectura de las muestras en los dos métodos.

Método ABTS

Al igual que el anterior, este método busca que el compuesto cromógeno ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina -6 -ácido sulfónico) que es de color verdoso, soluble en agua, disolventes orgánicos y químicamente estable, en presencia de un antioxidante, se inhiba la formación del radical que se traduce en una pérdida de la coloración verde azulado y se determina la reducción en una absorbancia de 734 nm. (Sanchez Leon 2012)

Para esta investigación, las lecturas se realizaron a 734 nm y una curva de calibración con Trolox de rangos entre 300µM a 1500µM, obteniendo la siguiente figura 21. Resultados obtenidos de los extractos en solvente Metanol y Cloruro de Colina. urea, bajo el método ABTS.

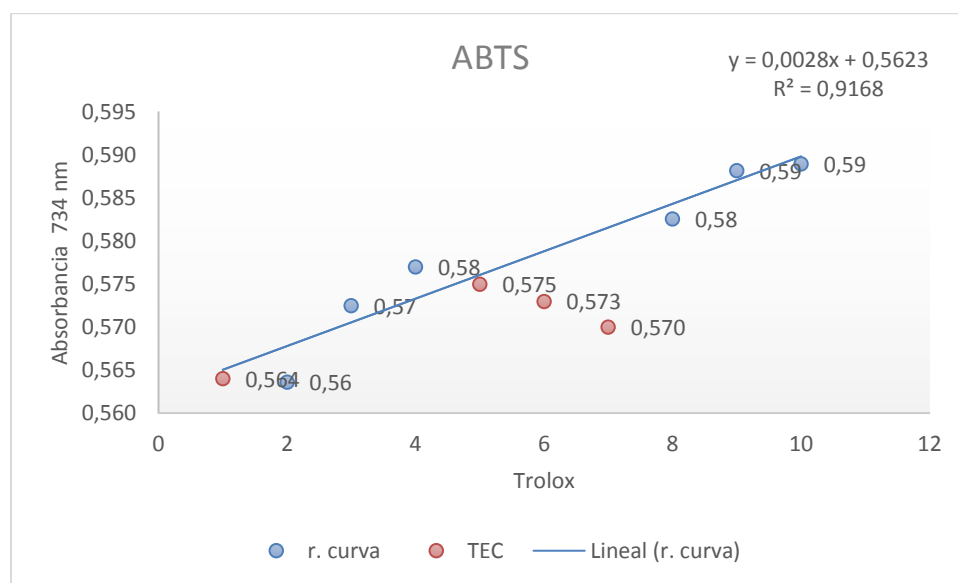


Figura 21. Intervalos de comparación entre resultados obtenidos de los extractos bajo el método ABTS con curva patrón de Trolox

Al analizar los resultados obtenidos en la Tabla 8. Resumen resultados de Laboratorio y graficados en la figura 21 anteriormente expuesta se observa que los valores obtenidos para el solvente cloruro de colina:urea en los rangos de: 30°C: $0,564 \pm 0,04$; 40°C: $0,573 \pm 0,04$ y 50°C: $0,575 \pm 0,06$, presentarán una diferencia entre 0,009 entre la temperatura de 30°C y 40°C y de 0,002 entre 40°C y 50°C, en cambio para el solvente metanol fue de $0,570 \pm 0,07$ sin obtener valores diferenciables altos entre los dos métodos, encontrando el mismo comportamiento que con el método de DPPH

Entre los autores que realizaron esta misma metodología de ABTS, encontramos a (Bernal, Melo, and Díaz Moreno 2014) en donde los sustratos se leyeron a 734 nm después de una reacción de 6 minutos, cada extracto leído por triplicado y los resultados informados como $\mu\text{mol Trolox } g^{-1}$ en fruto completo, determinándose un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,989$; obteniendo como actividad antioxidante en la Mora de Castilla $32,43 \pm 7,24 \mu\text{mol Trolox}$

g^{-1} , para nuestro estudio el coeficiente de determinación fue en valorado en $R^2=0,9168$ existiendo diferencia de 0,722, infiriendo que la metodología de lectura es adecuada.

Otro autor fue (Sanchez Leon 2012) con los estados de maduración E3 y E4 de los cuales el presente estudio fue tomado en esta misma escala de valor cuyos resultados se dieron en E3= $117,83 \pm 19.82$ y E4= $110,70 \pm 2.52$ μ moles Trolox/ g peso seco observando que la actividad antioxidante disminuye a medida que los frutos maduran, lo cual coincide con el comportamiento de la Mora eco tipo SINESP de este estudio (2012).

Valorado los resultados en la capacidad antioxidante tanto en el método de ABTS y DPPH algunas inferencias que se lograron deducir es que la metodología es compatible en dos tipos de solventes diferentes, al igual los mismos no influenciaron en los resultados del Cloruro de Colina: urea al determinarse valores con diferencias tan mínimas entre uno y otra variable, otro aspecto es que de acuerdo a la bibliografía hallada si es relevante es el estado de maduración y este fue una variable aunque no valorada cuantitativamente, si determinada para el comienzo de la investigación al determinarse con anterioridad su mayor resultados de actividad antioxidante al utilizar frutos según la tabla de NTC 4106, al igual que los valores de capacidad antioxidante se hace relevantes, si el análisis se realiza sobre el fruto total o sobre la pulpa, esto evidenciado en el estudio de (Liliana 2011) en donde ella utilizo solo la pulpa del fruto Mora de Castilla (*Rubus Glaucus Benth*) y su resultado de capacidad antioxidante fue de $0,223 \pm 0,022$ (mmol Trolox/g) menor a los resultados en promedio que se obtuvieron en cloruro de colina.urea que fueron de 0,570 mmol Trolox/g y el de Metanol que fue de 0,570 mmol Trolox/g., siendo mayor al utilizar la totalidad del fruto.

Identificación de antocianinas - Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia HPLC

Las antocianinas se identificaron a los 19 min comparando su retención tiempos con su respectivo patrón 3-glucosido. Los análisis de HPLC se realizaron por triplicado. Teniendo como resultado que el coeficiente de la curva de calibración como se puede observar en la figura 22, coeficientes de correlación de las curvas de calibración para todos los estándares fueron superiores a 0,99, lo que indica muy buena linealidad. Se determinó el límite de detección, la cantidad de estándar requerida para dar señal a ruido relación de 3, y el límite de cuantificación se determinó como la concentración más baja que da una relación señal / ruido de 10. La desviación (RSD%) es inferior a 0.96% e indica Grado de precisión adecuado este proceso también fue guiado por el proceso llevado por (Bosiljkov and Dujmi 2016), del cual se muestra la identificación del analito en estudio en la figura 23. Identificación de 3 cianidina – glucósido en la muestra 3 con solvente eutéctico

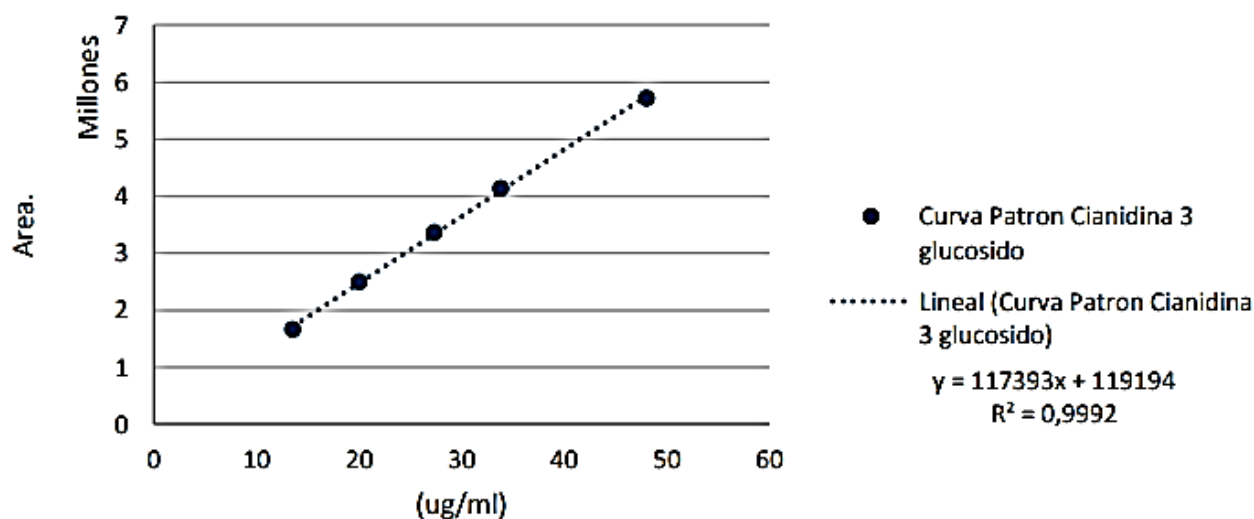


Figura 22. Curva promedio generada del patrón de cianidina- 3 glucósido.

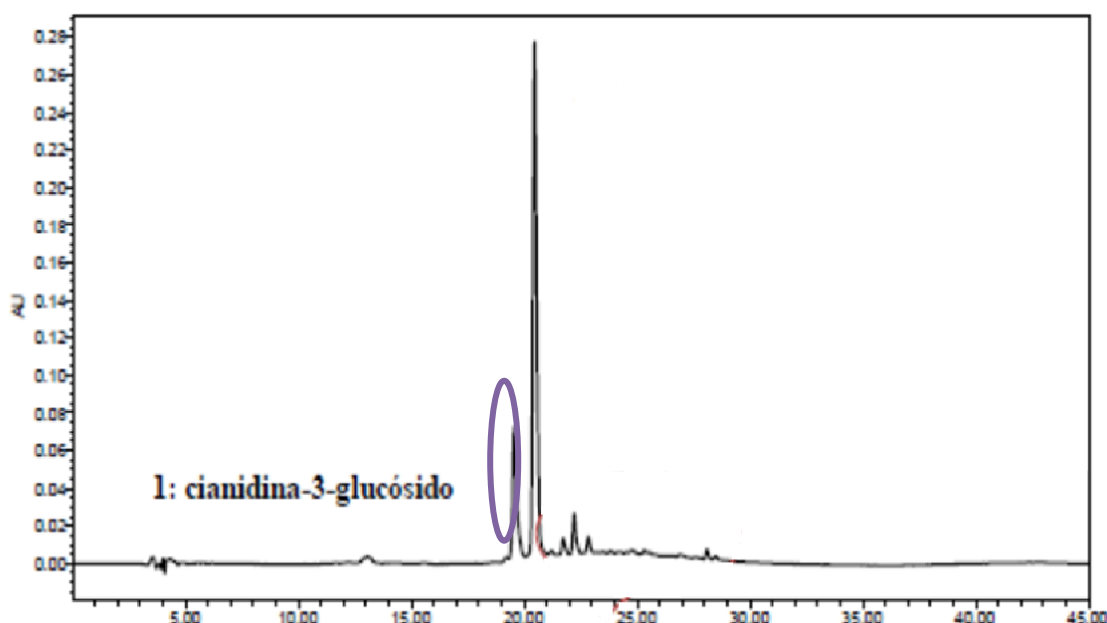


Figura 23 Identificación de 3 cianidina – glucósido en la muestra 3 con solvente eutéctico.

En otros estudios en la que han identificado por medio de HPLC-PDA cromatograma (518 nm) para extracto de Mora obteniendo su identificación con una $m/z = 499$ a los 6,4 minutos, mucho menor que con los resultados de este estudio. (Garzón et al, 2009).

Otro autor realizó el análisis de Mora de Castilla en HPLC con arreglo de diodos y como solvente metanol/acido- orto fosfórico (99,9/0,1 v/v) identificando al metabolito 3-cianidina a los 37 minutos, siendo mejor los resultados adquiridos con el método expuesto en esta investigación (Mertz et al, 2007).

Dado estos ejemplos la identificación de los metabolitos refiere y tiene en cuenta el tipo de solvente de las fases y la matriz de la extracción para nuestro estudio la característica fisicoquímica de viscosidad del Cloruro de Colina fue un medio que causo inconvenientes siendo necesario utilizar ácido fórmico y metanol buscado que se disolviera el cloruro sin perder características.

8. CONCLUSIONES

La presente investigación buscó establecer y dar respuesta a unos objetivos planteados desde un aspecto general a unos específicos, los cuales se responden bajo los siguientes parámetros:

- A lo largo del estudio, se tuvo como objetivo establecer que las variables de tiempo en maceración, temperatura y maceración asistida por ultrasonido afecta el rendimiento del extracto en un solvente como el Cloruro de Colina: urea; para lo cual aunque estas tres variables fueron evaluadas en este sentido, los resultados numéricos tanto del laboratorio como estadísticos en Excel 2016 y el programas SPSS nos dejaron corroboran que las diferencias no fueron significativas en relación al rendimiento (Y%), por lo que nos hace suponer que las variables se encontraban en rangos muy próximos y no se logró determinar un cambio de valores significativos.

De igual manera para el método de guía en donde el solvente a utilizar fue el Metanol, no se logró determinar diferencias amplias, pero si no determino que la metodología determinada genera resultados aceptables y cercanos al uso del solvente convencional.

- En relación a la capacidad antioxidante dada por los métodos DPHH y ABTS tuvo los mismos resultados que el rendimiento, donde la diferencias no se encontraron en valores significativos en los rangos establecidos para evaluar el solvente Cloruro de Colina: urea, pero sí muy cercanos a los obtenidos al solvente tradicional metanol.

- Al igual el Contenido Total de Fenoles (CTF) y Contenido Total de Antocianinas (CTA) algunas inferencias que se lograron deducir es que la metodología es compatible en los dos tipos de solventes diferentes, al igual las variable no influenciaron en los resultados del Cloruro de Colina: urea, al determinarse valores con diferencias tan mínimas entre uno y otra variable, otro aspecto, es que de acuerdo a la bibliografía hallada si es relevante es el estado de maduración y este fue una variable aunque no valorada cuantitativamente, si determinada para el comienzo de la investigación al utilizarse con anterioridad los tipos frutos E3 y E4 denominados en la Norma Técnica Colombiana 4106 con mayor resultados de actividad antioxidante.

Este tipo de resultados ayudó a predecir que los comportamientos generados en la producción de antocianinas son similares a los de la literatura, aunque cabe recalcar, que la dispersión de estos depende del tipo de metodología de extracción, las condiciones edáficas y ambientales del fruto. Por ejemplo un estudio realizado con *Acai* por Rojano, 2005 encontró concentraciones de antocianinas de 268,5 mg /100g muestra en el 2011, luego otro investigador toma como referencia la misma industria colombiana, para realizar el reporte del contenido de antocianinas presente en dicho fruto, con un valor de 4,58 mg/100g de muestra, llegando a la conclusión que es necesario recurrir a estudios físico químicos de mayor profundidad, para comparar la variación de resultados, siendo un mismo sitio y fruto de análisis (Díaz Kelly, 2019).

Los resultados determinados en nuestro proceso, conservaron y mantuvieron los parámetros de búsqueda bibliográfica; la actividad antioxidante para el solventes NADES en los frutos de Mora de Castilla, presento resultados positivos de actividad antioxidante a una temperatura de $40^{\circ}\text{C} = 0,325 \pm 0,03$ en fruto con semilla y que los parámetros de tipo de maduración establecidos

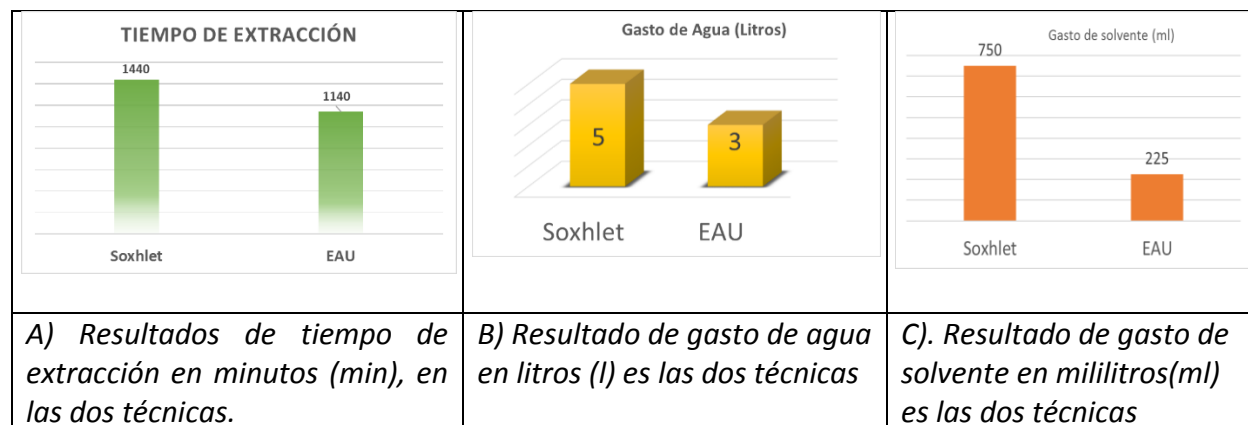
en la carta de colores NTC 4106 si se encuentran relacionados a esta cualidad; además que el parámetro de lectura con respecto a la λ se encuentra entre los 514 nm y 515 nm, obteniendo resultados adecuados

- Para el uso del instrumental de HPLC para el Cloruro de Colina: Urea, fue un reto analítico, toda vez que las propiedades físicas del producto preparado generó una alta viscosidad, lo cual fue necesario establecer un método para lograr analizarlo, y lograr la identificación del metabolito 3- cianidina en un tiempo de 19 minutos, generó una guía para posteriores estudios de mejoramiento en este proceso.
- Otro aspectos a determinar es el análisis de las metodologías de extracción, fue la relación a la mejoras del proceso para los cual el primer punto a tomar en cuenta fue **tiempos utilizados**; en la aplicación del método convencional (Soxhlet) fue observable que el proceso es lento e imposible de acelerar dado el ciclo de extracción, para las tres muestras evaluadas en este método, se utilizó un tiempo de 1.440 minutos; en cambio para el método de (EAU) el tiempo de nueve muestras fue de 1.140 minutos, existiendo una diferencia de 300 minutos en el proceso de consumo.

En el segundo punto a considera fue la **relación al uso del agua**, el primer método (Soxhlet) tuvo un gasto de las tres muestras de alrededor de 5 litros recirculados y para el segundo método (EAU) se utilizó, 3 litros en las nueve muestras, los cual en ambos procesos se hizo uso de esta agua, en el lavado de instrumentos de laboratorio.

Por último, el tercer aspecto a tomar en cuenta es el **gasto del solvente utilizado**, para el primer método se dio sobre los 750 mL de Metanol al 0,001 HCl al 99.8 % de concentración y en el segundo método fue de 225 mL de Cloruro de Colina: Urea al 98% de concentración, resultados que se pueden observarse en la figura 24 que los resume de manera gráfica la comparación:

Figura 24. Resumen de los procesos de extracción en A) tiempo, B) gasto de agua y C) gasto de solvente.



Esto podría expresar que en relación al mejoramiento de proceso, la técnica de la Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU) confirma las cualidades con la que cuenta el método, al reducir el procedimientos de consumo, tiempo de energía, reducción del uso de agua y generación de sustancias peligrosas contribuyendo a la preservación ambiental, hipótesis valorada por (.C.N Quiroz-Reyes, M.A. Aguilar –Méndez 2013).

Otro autor que refiere en este tipo de resultados fue (Bosiljkov and Dujmi 2016) en donde afirma que la transferencia de calor y masa proporcionada por el ultrasonido mejora la calidad del extracto, esto atribuido principalmente a los efectos acústicos que están acompañados por fenómenos de cavitación optimizando el proceso, el flujo continuo de un sistema ultrasónico que hace que la célula genere cantidades mayores de compuestos extraídos.

De la misma manera (Rojas-Llanes, Martínez, and Stashenko 2014) en su estudio determina que uno de los inconvenientes de la extracción con solventes es el tiempo requerido, motivo por el cual la extracción de ultrasonido es una tecnología económica y sencilla que mejora el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos con menores temperaturas y tiempos que los

requeridos en las extracciones convencionales con solventes, esto atribuido a que las microcorrientes fluídicas que generan el ultrasonido, dan mayor penetración del solvente en el material vegetal.

- Por último y no menor importante es calificar el solvente Cloruro de Colina. urea bajo las cualidades de la Química verde, para esto fue necesario remitirnos a la bibliografía encontrada en relación, toda vez que para una comparación efectiva con el solvente Metanol se hacía necesario evaluar en las mismas condiciones de variables, de esta manera se encontró las siguientes conclusiones de uso así:

(Rojas-Llanes, Martínez, and Stashenko 2014) en su estudio de “*Extractos de mora obtenidos bajo diferentes condiciones...*”, determinaron que el mejor resultado obtenido para la extracción de antocianinas se realizó con Metanol bajo una concentración del (98 %) resultado que se le atribuye a que el solvente contiene un fragmento alifático más pequeño que el Etanol y de esta manera, se enlaza más fácilmente con los compuestos fenólicos presentes en la Mora de Castilla, cuyas estructuras los hacen preferiblemente extraíbles por solventes polares próticos, mediante la formación de enlaces de hidrógeno.

(Leyva Daniel 2009) refiere también, que como métodos de extracción de antocianina el método del 0,001 HCl en metanol es el más efectivo pero el HCl es corrosivo y el metanol tiene efectos tóxicos en la salud humana.

Otra autora fue, (Sanchez León 2012) que menciona en su tesis de “*Determinación de Antocianinas en licores y fruto de mora*”, que como solvente se usa HCl al 1% en Metanol en la extracción de antocianinas, ya que posee bajo puntos de ebullición y permite más rápida

concentración del material extractado, sin embargo, los extractos resultantes pueden contener contaminante de baja polaridad.

Para el caso de solvente NADES el Cloruro de Colina: urea el cual (Bosiljkov and Dujmi 2016) en su estudio evaluó siete diferentes NADES a base de colina probados en la extracción de Antocianinas para lo cual, el Cloruro de Colina: Urea, enunció las siguientes características: (1) presentan solubilidad de rutina más alta que etanol o metanol. (2) su solubilidad y propiedades físicas se pueden modular agregando agua en su composición.

(Abbott y col., 2002). Zhu y col. (2006), reportaron al solvente eutéctico ChCl/urea (1:2) como catalizador eficiente de la reacción de epóxidos con CO_2 para formar carbonatos cíclicos con alta selectividad, conversión y sin solventes; Los solventes eutécticos basados en cloruro de colina han sido principalmente en la sal cuaternaria de amonio cloruro de colina, debido a la baja toxicidad y bajo costo, en Europa esta sal es clasificada como provitamina y es producida a gran escala para suplemento en la alimentación animal. Por sus características los solventes eutécticos basado en cloruro de colina podrían tener un uso potencial en productos con interacción en sistemas biológicos.

Además, (Rita, 2010) concluye que las mezclas eutécticas de cloruro de colina-urea en proporción 1:2 respectivamente, presentan alta solubilidad en diferentes sustancias orgánicas, sales escasamente solubles en agua, ácidos aromáticos y aminoácidos, y al poseer alta concentraciones de aniones pueden disolver varios óxidos de metales y con sus propiedades pueden ser utilizados en procesos químicos y extracción de metales.

Es de esta manera que se hace necesario evaluar en las mismas condiciones varios tipos de solventes denominado como NADES con el fin de corroborar sus cualidades físico- químicas para valorar como solvente “verde”.

RECOMENDACIONES

Es necesario que para la valoración efectiva los tipos de solvente estos sean valorados en las mismas condiciones en variables y en métodos de extracción iguales.

Se recomienda que, para próximos estudios, la variable de pH, se aumente con el fin de corroborar la hipótesis, de que, a mayor pH, mayor será la concentración de antocianinas esto en atención a que es necesario hacer un seguimiento a las cualidades físico- químicas entre ella el pH que afectan la estabilidad de los pigmentos antociánicos debido a que es un compuesto inestable que se degrada por cambios en el pH, oxígeno, luz, temperatura, ácido ascórbico, reguladores de crecimiento y oxígeno que causa bajos rendimientos y degradación de los pigmentos (Kelly Johana Díaz Rincón 2019)

Otro factor a tener en cuenta es el oxígeno y el ácido ascórbico, estos dos compuestos influyen en la estabilidad de las antocianinas debido a que la mayoría de las frutas contienen ácido ascórbico y dependiendo también de las condiciones (luz, madurez) y disponibilidad de oxígeno en las que se encuentre dicha fruta va a provocar una degradación de las antocianinas a causa de la formación de peróxido de hidrogeno durante la oxidación.(Díaz Kelly,2019)

El estudio aquí valorado, utilizo reactivo de tipo y concentración analítico al 99,8 % por lo que se hace necesario evaluar las mismas condiciones con la presentación industrial y comparar los resultados que se pueden obtener.

BIBLIOGRAFÍA

- C.N Quiroz-Reyes, M.A. Aguilar –Méndez, M.E. Ramírez-Ortíz y E. Ronquillo –de Jesús. 2013. “Quiroz Reyes. Estudio Compartivo Entre Ultrasonido y Maceración.” *Universidad Nacional Autónoma de México y Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada el Instituto Politécnico Nacional. México* 12(1): 11–18.
- Arévalo Peñaranda, Emilo, Ana Luisa Díaz Jiménez, José Roberto Galindo Álvarez, and María Rosmira Rivero Cruz. 2011. “Manejo Fitosanitario Del Cultivo Del Mora (Rubus Glaucus Benth) Medidas Para La Temporada Invernal.” *Ica*: 32.
- Bernal, Luisa Juana, Laura Angélica Melo, and Consuelo Díaz Moreno. 2014. “Evaluation of the Antioxidant Properties and Aromatic Profile During Maturation of The Blackberry (Rubus Glaucus Benth) and The Bilberry (Vaccinium Meridionale Swartz).” *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 67(1): 7209–18.
- Bosiljkov, Tomislav, and Filip Dujmi. 2016. “Food and Bioproducts Processing Natural Deep Eutectic Solvents and Ultrasound-Assisted Extraction : Green Approaches for Extraction of Wine Lees Anthocyanins.” 2: 195–203.
- Carmen Menéndez Soriano. 2012. “Efectos Vasculares de La Quercetina y La Catequina: Interacciones y Papel de Los Procesos de Conjugación y Desconjugación Metabólica. Universidad Complutense de Madrid.” : 3–6.
- Cartaya, O., and Ines Reynaldo. 2001. “Reseña Bibliográfica FLAVONOIDES : CARACTERISTICAS QUÍMICAS Y APLICACIONES O . Cartaya ☒e Inés Reynaldo.” *Cultivos tropicales* 22(2): 5–14.
- Casado Pascual, Ana. 2016. “Comportamiento Electroquímico Del Ión Cu(I) Sobre Electrodo de Platino En El DES (‘Deep Eutectic Solvent’) Cloruro de Colina- Urea 1:2.” Universidad de Valladolid. <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/19154>.
- Castaño, Edwin, and Angye Espinosa. 2016. “Determinación Del Valor Nutricional y Nutraceutico de Frutos Maduros Del Material Sin Espinas de Rubus Glaucus Benth (Mora de Castilla) Cultivados En El Municipio de Mistrató Risaralda.” *Universidad Tecnologica de Pereira*. <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/6782/63438C346.pdf?sequence=1>.
- Celia, Mera Morillo. 2015. “Desarrollo de Técnicas de Extracción y Análisis de Antocianinas y Compuestos Fenólicos En Jaboticara.” Universidad de Cádiz. [file:///C:/Users/heras/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/Moderna - 1995 - Universidad de cádiz.pdf](file:///C:/Users/heras/AppData/Local/Mendeley%20Ltd./Mendeley%20Desktop/Downloaded/Moderna%20-1995%20-%20Universidad%20de%20cádiz.pdf).
- Chancusig, Edwin. 2012. “Rubus Glaucus.”
- Choi, Young Hae et al. 2011. “Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology?” *Plant Physiology* 156(4): 1701–5.
- Cicci, Agnese, Giorgia Sed, and Marco Bravi. 2017. “Potential of Choline Chloride - Based Natural Deep Eutectic Solvents (NaDES) in the Extraction of Microalgal Metabolites.” *Chemical Engineering Transactions* 57: 61–66.
- Dai, Yuntao. 2013. *Natural Deep Eutectic Solvents and Their Application in Natural Product Research*

and Development. www.sps-print.eu.

Ferrazzano, Gianmaria F. et al. 2011. "Plant Polyphenols and Their Anti-Cariogenic Properties: A Review." *Molecules* 16(2): 1486–1507.

Franco-Vega, A et al. 2014. "Líquidos Iónicos : Una Alternativa ' Verde ' Para Procesos de Extracción En La Industria de Alimentos." *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 8(1): 15–26.
<http://www.nature.com.docelec.u-bordeaux.fr/pj/journal/v46/n11/abs/pj201464a.html%5Cnfiles/1880/pj201464a.html>.

Hammond, Oliver S., Daniel T. Bowron, and Karen J. Edler. 2016. "Liquid Structure of the Choline Chloride-Urea Deep Eutectic Solvent (Reline) from Neutron Diffraction and Atomistic Modelling." *Green Chemistry* 18(9): 2736–44.

Juana, Luisa, and Bernal Roa. 2012. "Evaluación de Las Propiedades Bioactivas de Mora (Rubus Glaucus) y Agraz (Vaccinium Meridionale Swartz), En Fresco y Durante Procesos de Transformación."

Kelly Johana Díaz Rincón. 2019. "Estandarización de Procesos de Obtención de Antocianinas a Partir de Callos de Mora (Rubus Glaucus Benth) Mediante Las Técnicas de Suspensiones Celulares." *Universidad de Santander. Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agropecuarias. Programa de Microbiología Industrial* 51(1): 51.

Leyva Daniel, D. E. 2009. "Determinacion De Antocianinas, Fenoles Totales Y Actividad Antioxidante En Licores Y Frutos De Mora." Universidad Tecnológica de la Mixteca.
[file:///D:/TESIS/BIBLIOGRAFIA/Diana Leiva.Determinación de antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante en licores y fruto de mora.pdf](file:///D:/TESIS/BIBLIOGRAFIA/Diana%20Leiva/Determinaci%C3%B3n%20de%20antocianinas,%20fenoles%20totales%20y%20actividad%20antioxidante%20en%20licores%20y%20fruto%20de%20mora.pdf).

Liliana, Santacruz. 2011. 16 "Análisis Químico de Antocianinas En Frutos Silvestres Colombianos." Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química.

Llama, D E L A et al. 2015. "Ca Cu Io Ca Cu."

Llerena Silva, Wilma Maribel. 2014. "Estudio de La Relación Entre El Color y El Contenido de Antioxidantes de Seis Frutas Tropicales y Andinas: Arazá (Eugenia Stipitata), Mora (Rubus Glaucus) Variedad Iniap Andimora 2013, Mortiño (Vaccinium Floribundum Kunth), Naranjilla (Solanum Quitoense)." : 314.

Maquilón Albaladejo, Cristina. 2014. "Complejos Metálicos Para La Captura y La Fijación de CO2 En Moléculas Orgánicas de Disolventes Eutécticos." : 56.

Monica, Ospina. 2017. *POE ABTS*.

Monroy Vázquez, Agustín, Alfonso Totosaús, and Ignacio García Martínez. 2005. "EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES DE CHILE ANCHO Y ROMERO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ETANOL:AGUA." *Ann. Nutr. Metab. Cienc. Tecnol. Aliment. Campinas J. Foods Sci. African J. Biotechnol. Am. J. Enol. Vitic* 47(16): 405–10.

Osorio, Monica. 2017. "POE Fenoles."

Ospina, Monica. 2017. *POE DPPH*.

Pajaro, Nerlis, and Jesus Tadeo. 2011. "Química Verde: Un Nuevo Reto Green Chemistry: A New

Challenge.” *Ciencia E Ingenieria Neogranadina* 21(2): 169–82.

Pilar Rojas-Llanes, Jennifer, Jairo René Martínez, and Elena E. Stashenko. 2014. “Contenido de Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante de Extractos de Mora (*Rubus Glaucus Benth*) Obtenidos Bajo Diferentes Condiciones.” *Vitae* 21(3): 218–27.

Sanchez Leon, Dora Elisa. 2012. *Estudio Del Potencial Antioxidante de La Mora (Rubus Glaucus Benth) y Sus Cambios En Función Del Proceso de Maduración y Bajo Diferentes Temperaturas de Almacenamiento*. <http://www.bdigital.unal.edu.co/10581/1/197422.2012.pdf>.

Vásquez Carreño, Diana Rocío. 2012. “El Orégano de Monte (*Lippia Origanoides*) Del Alto Patía: Efecto Del Método de Obtención de Sus Extractos Sobre La Composición y La Actividad Antioxidante de Los Mismos.” : 105.